

INAUGURAL- DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Chemikerin Pia Irena Heinlein
aus Mönchengladbach

Tag der mündlichen Prüfung: 20. März 2009

In vivo Markierung von Zellen
zur Untersuchung von
Diffusionsprozessen mithilfe der
Bildgebenden Diffusionsmikroskopie (DIFIM)

Gutachter: Prof. Dr. J. Wolfrum
Prof. Dr. R. Krämer

Kurzfassung

Diese Arbeit widmet sich der Anwendung der in den letzten Jahren entwickelten Bildgebenden Diffusionsmikroskopie (DIFIM) auf lebende Zellen. Die Methode erlaubt die Detektion von Intensitätsfluktuationen über einen großen, mehrere Mikrometer umfassenden Bereich. Sie ermöglicht zugleich die Diskriminierung des Fluoreszenzsignals von störender Hintergrundfluoreszenz anhand von Fluoreszenzlebensdauer-messungen. DIFIM wurde an einem Testsystem in lebenden Zellen, bestehend aus einem farbstoffmarkierten Oligonukleotid, welches an den PolyA-Strang der zelleigenen mRNA hybridisieren kann, untersucht. Es wurde gezeigt, dass es mithilfe von DIFIM möglich ist, unterschiedliche Diffusionszeiten in lebenden Zellen zu visualisieren. Damit wurde der Grundstein gelegt, um Wechselwirkungen verschiedener Proteine innerhalb einer Zelle zu verfolgen.

Zur Demonstration der Anwendbarkeit von DIFIM in der Biologie wurde der JAK-STAT-Signalweg genauer untersucht. Im Speziellen sollte die Diffusion des Proteins STAT5b verfolgt werden. Hierfür wurde zunächst die *in vivo* Markierung des Proteins mit einzelmolekülauglichen, rot fluoreszierenden Farbstoffen untersucht. Zur Markierung wurde ein Fusionsprotein mit dem sogenannten *SNAP-Tag* eingesetzt, der eine spezifische kovalente Bindung synthetischer Farbstoffe an gewünschte Proteine ermöglicht. Es stellte sich heraus, dass die Markierung mittels Inkubation unspezifisch war, weshalb die Markierung unter Verwendung von Transfektionsreagenzien durchgeführt wurde. Auch diese ermöglichten in lebenden Zellen keine charakteristische Markierung. Weiterführend wurden Zellen mit einem Fusionsprotein aus STAT5b und mCherry, ein Derivat des Rot-Fluoreszierenden Proteins, transfiziert. Derartig behandelte Zellen ermöglichten es erstmals, Unterschiede in Diffusionszeiten in *in vivo* DIFIM-Messungen zu beobachten.

Abstract

This work has been dedicated to the application of the recently developed Diffusion Imaging Microscopy (DIFIM) to living cells. The method allows the detection of intensity fluctuations over a large, several micrometer comprising region. Furthermore the discrimination of the fluorescence signal from disturbing background fluorescence is enabled by means of fluorescence lifetime measurements. DIFIM was studied using a test system, composed of a dye labelled oligonucleotide, which can hybridise to the polyA-tail of natural cell mRNA. It has been shown that DIFIM enables the visualisation of varying diffusion times *in vivo*. Therewith the basis for investigations of interactions between various proteins within a cell was established.

For demonstration of the applicability of DIFIM in biology the JAK-STAT signalling pathway was examined in more detail. Especially diffusion of the protein STAT5b should be tracked. Therefore, *in vivo* labelling of the protein using synthetic red fluorescing markers suitable for single-molecule experiments were employed at first. A fusion protein with the so-called *SNAP-Tag* was adopted as marker. The *SNAP-Tag* allows a specific covalent bonding of synthetic dyes to a favoured protein. It turned out that labelling via incubation was unspecific. For this reason marking using different transfection reagents was examined, but these, enables no specific labelling, as well. Continuatively cells were transfected with a fusion protein containing STAT5b and mCherry, a derivative of the red fluorescent protein. Using those cells, it firstly succeeded to gain differences in diffusion times within *in vivo* DIFIM measurements

Meinem Mann Thomas,
meinem Sohn Quirin Alexander
und Hans Eisenbahn.

ZUSAMMENFASSUNG

Bahnbrechende Fortschritte in der Biologie, wie beispielsweise die Entschlüsselung des menschlichen Genoms, haben in den letzten Jahren dazu beigetragen, neue Erkenntnisse über den strukturellen Aufbau und die biochemischen Zusammenhänge in lebenden Organismen zu erlangen. Durch das neue Wissen wurden aber auch weiterführende Fragestellungen aufgeworfen, die sich auf zunehmend kleinere und schwerer nachzuweisende Objekte, wie z. B. einzelne Proteine oder Viren, konzentrieren, die mit herkömmlichen molekularbiologischen Methoden oftmals nicht zu untersuchen sind. In fachübergreifenden Kooperationen von Zell- und Mikrobiologen, sowie Biochemikern mit Wissenschaftlern aus der Physik und Chemie, wurden neue Methoden entwickelt, mit denen solche Probleme gelöst werden können. Besonders die Einzelmolekülspektroskopie, ursprünglich eine rein physikalisch-chemische Methode, erweist sich gegenwärtig als sehr potentes Verfahren, Untersuchungen an biologischen Systemen, wie beispielsweise einzelnen lebenden Zellen, durchzuführen. Durch die Reduzierung des Anregungsvolumens auf wenige Femtoliter und die Entwicklung hochsensibler Halbleiterdetektoren wurde es möglich, einzelne Fluorophore nachzuweisen. Eine weitere Entwicklung ist die STED-Mikroskopie (STED – *Stimulated Emission Depletion*), mit der Untersuchungen an Strukturen und somit auch Proteinumgebungen durchführbar sind, die kleiner als die von Ernst Abbé postulierte Auflösungsgrenze der halben eingestrahlten Wellenlänge sind [Willig 2006]. Mithilfe von Einzelpartikelverfolgung (SPT – *Single Particle Tracking*) ist es möglich, die Bewegung einzelner Partikel oder Proteinrezeptoren über längere Zeit mit einer Kamera zu verfolgen und so deren Transportwege zu erforschen [Gosh 1994].

Eine andere Methode zur Untersuchung von Transportprozessen und Diffusionsgeschwindigkeiten ist die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) [Schwille 2004]. Hier werden Informationen durch die Detektion von Intensitätsschwankungen bzw. -fluktuationen erhalten, die dadurch zustande kommen, dass einzelne Fluorophore bei ihrem Durchtritt durch das fokale Volumen angeregt werden. Durch anschließende Korrelation der erhaltenen Photonenankunftszeiten werden Informationen über die Konzentration der Teilchen, wie auch die Schnelligkeit der Bewegung erhalten. Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie birgt den Nachteil, dass sie auf sehr kleine Volumina (in der Regel das fokale Volumen eines Mikroskops) beschränkt ist. Weiterentwicklungen auf größere Bereiche sind bereits aus mehreren

Publikationen bekannt [Peterson 1993; Meinhart 1999; Kuricheti 2004]. In dieser Arbeit wird die in den letzten Jahren entwickelte Bildgebende Diffusionsmikroskopie (DIFIM – *Diffusion Imaging Microscopy*) [Roth 2006] weiter verfolgt. Diese Methode erlaubt die Detektion von Intensitätsfluktuationen über einen größeren, zumeist mehrere Mikrometer großen Bereich. Durch die implementierte Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie (FLIM) besitzt sie den Vorteil, das gewünschte Fluoreszenzsignal von störender Hintergrundfluoreszenz diskriminieren zu können. Anhand dieser Voraussetzungen ist zu erwarten, dass die Methode für die Untersuchung von Diffusions- bzw. Transportprozessen innerhalb lebender Zellen vielversprechende Ergebnisse liefert. In dieser Arbeit sollte daher DIFIM in lebenden Zellen erprobt werden.

Hierzu wurde zunächst ein Testsystem untersucht, in dem ein farbstoffmarkiertes Oligonukleotid in Zellen inkubiert und an den polyA-Strang der mRNA hybridisiert wurde. Anhand dieses Testsystems konnte gezeigt werden, dass DIFIM geeignet ist, um unterschiedliche Diffusionszeiten *in vivo* über einen großen Bereich der Zelle aufzulösen. Es ist möglich, verschiedene Kompartimente, die sich durch eine unterschiedliche Viskosität auszeichnen, sichtbar zu machen oder Proben unterschiedlicher Größe zu unterscheiden. Zusätzlich sollte es möglich sein, Modifizierungen bzw. Wechselwirkungen bestimmter Proteine innerhalb der Zelle aufzulösen. Um die Anwendbarkeit von DIFIM in der Biologie zu demonstrieren, wurde der JAK-STAT-Signalweg genauer untersucht. Hierfür wurde das zu untersuchende, am Signalweg beteiligte Protein STAT5b (STAT – *Signal Transducers and Activators of Transcription*), welches im Zytoplasma bevorzugt als Monomer vorliegt, an GFP (*Green Fluorescent Proteine*) fusioniert. Im Zellkern aktiviert es als Dimer die Transkription von DNA. In ersten Untersuchungen mit der Bildgebenden Diffusionsmikroskopie stellte sich GFP jedoch als photolabil heraus und motivierte die Suche nach besser geeigneten Fluoreszenzmarkern. Diese sollten charakterisierte und photostabile Farbstoffe spezifisch an gewünschte Proteine binden.

Daher wurde der *SNAP-Tag* als Methode für die kovalente Markierung von Proteinen mit synthetischen Farbstoffen untersucht [Juillerat 2003; Keppler 2004]. Dieser leitet sich von dem humanen Protein O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (hAGT) ab, welches in Zellen als DNA-Reparaturprotein vorkommt. Im Falle des *SNAP-Tags* wurde das Protein dahingehend modifiziert, dass es spezifisch *para*-substituierte Benzylguaninverbindungen erkennt und diese „repariert“, sodass anschließend nichtmodifiziertes Guanin und eine kovalente Bindung zwischen der Thiolgruppe des hAGT und dem Benzylring resultiert. Er bietet einerseits den Vorteil, dass er im Vergleich zum GFP (27 kDa) kleiner ist (etwa 20 kDa) und damit das zu untersuchende Protein weniger

beeinflusst. Andererseits bietet diese Variante der Markierung mit synthetischen Farbstoffen die Möglichkeit, die ungünstige Photophysik der fluoreszenten Proteine zu umgehen. Weiterhin besteht wegen der freien Auswahl an Farbstoffen die Möglichkeit, das gesamte sichtbare Spektrum für die Fluoreszenzuntersuchungen zu nutzen. Für die Markierungstests wurden fünf verschiedene Farbstoffe im roten Spektralbereich gewählt, die eine hohe Photostabilität aufweisen. Die Farbstoffe wurden an Benzylguanin (BG) gekoppelt, welches in der Lage ist, mit dem *SNAP-Tag* zu reagieren. Anschließend wurden die Substrate durch Inkubation in die Zellen geschleust. Nach der Inkubation zeigte sich, dass keines der Farbstoff-Substrate, unabhängig vom verwendeten Zelltyp, in der Lage war, den *SNAP-Tag* spezifisch in der Zelle anzufärben. Anschließend wurde anstelle des BG-Substrates ein kleineres, ebenfalls mit dem *SNAP-Tag* reagierendes Reagenz (CP) verwendet, welches aufgrund seiner geringeren Größe und Lipophilie einen besseren Transporter durch die Zellmembran darstellen sollte. Auch mit diesem Substrat zeigte sich, dass die Markierung unspezifisch war. Es konnte keine Markierung des *SNAP-Tag* erreicht werden. Im Folgenden wurde untersucht, ob die Verwendung von Transfektionsreagenzien, wie Lipofectamine 2000 und Streptolysin O dieses Problem der schlechten Membrangängigkeit umgehen können. Die Experimente legten nahe, dass die Zellen im Zytoplasma unspezifisch angefärbt wurden. Der im Zellkern befindliche *SNAP-Tag* wurde nicht markiert. Die Farbstoffe wechselwirken aufgrund ihrer Lipophilie sehr gut mit der ebenfalls nach außen lipophilen Membran und verhindern so die spezifische Markierung in der Zelle.

Als Alternative wurde daher das fluoreszente Protein mCherry untersucht, welches sich durch eine verbesserte Photostabilität gegenüber dem monomeren RFP, und damit auch gegenüber GFP, auszeichnet. Um dies zu untersuchen, musste zunächst ein neuer Laser angeschafft werden, der die Anregung und Untersuchung dieses Proteins erlaubt, welches im gelben Wellenlängenbereich absorbiert (587 nm). Hiermit konnte gezeigt werden, dass die Korrelation von mCherry stark von der eingestrahlten Intensität abhängig ist. So nimmt mit zunehmender Anregungsintensität der Anteil an schnell fluktuierenden Molekülen, d. h. der Anteil der Moleküle die schnell zwischen einem fluoreszenten und einem nichtfluoreszenten Zustand wechseln, zu. Weiterhin wird bei erhöhter Anregungsleistung zunehmend Photobleichen beobachtet. Aus diesem Grund wurde für nachfolgende Zelleexperimente eine mittlere Anregungsintensität gewählt, um das Photobleichen von mCherry möglichst gering zu halten, trotzdem aber genügend Photonen für eine aussagekräftige Korrelation detektieren zu können. Nach Klonierung von mCherry an das Protein STAT5b und anschließender Transfektion in lebende Zellen, konnten erste DIFIM-Messungen durchgeführt und Diffusionsbilder erhalten werden.

Diese zeigen Heterogenitäten in der Diffusion, sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma. Allgemein wird im Zellkern eine langsamere Diffusion als im Zytoplasma erhalten, welche durch Wechselwirkung des Proteins mit DNA und anderen, für die Transkription notwendigen Proteinen, erklärt werden kann.

Es konnte damit erstmals gezeigt werden, dass DIFIM eine geeignete Methode darstellt, um Diffusionskarten von Zellen und Zellkompartimenten zu erstellen und so neue Informationen über zelluläre Transportwege zu erhalten. Des Weiteren ist mit mCherry ein potentieller Fluoreszenzmarker für die bildgebende Diffusionsmikroskopie gefunden worden, der genauere Untersuchungen des JAK-STAT-Signalweges motiviert. So sollte es möglich sein, Wechselwirkungen mit DNA und anderen für die Transkription notwendigen Proteinen zu verfolgen und daraus Informationen über den Transportzyklus der Proteine zwischen Kern und Zytoplasma zu erhalten. Zusätzlich besteht mit einem kürzlich erworbenen Injektionssystem die Chance, die BG- bzw. CP-Substrate im roten Spektralbereich in die Zellen zu injizieren und damit den *SNAP-Tag* spezifisch anzufärben. Zusammen mit anderen einzeilmolekülspektroskopischen Methoden, wie z. B. der Koinzidenzanalyse, PALM oder FRET und weiteren biologischen Experimenten sollte es so möglich sein, mathematische Modelle des Signalwegs zu validieren und zu verbessern, um Zellprozesse besser zu verstehen und Möglichkeiten für deren Regulierung zu erforschen.

SUMMARY

In recent years innovative progress in biology and biochemistry, such as the decoding of the human genome, contributed to new findings of structural assemblies and biochemical coherences in living organisms. However, this knowledge leads to further questions focusing on increasingly smaller objects, for instance single proteins or viruses. Detection of those particles gets more difficult with decreasing size. As a result, conventional methods in molecular biology are often insufficiently sensitive for their examination. By interdisciplinary co-operation of cell- and microbiologists, as well as biochemists together with scientists from physics and chemistry, new methods are being developed, which aim to solve these problems. In particular single molecule spectroscopy, originally a pure physicochemical method, currently turns out to be a very powerful technique for the investigation of biological systems, such as single living cells. By the reduction of the excitation volume to a few femtoliters and the development of highly sensitive semiconductor detectors, it now becomes possible to detect single fluorophors. A further development is STED microscopy (STED – Stimulated Emission Depletion). This method enables the examination of structures that are smaller than the resolution limit of half the irradiated wavelength (*i.e.* > 300 nm), as postulated by Ernst Abbé [Willig 2006]. Therefore STED exhibits a prerequisite for the investigation of protein environments on the molecular level. Single Particle Tracking (SPT) uses CCD-cameras to follow the movement of single particles or protein receptors over an extended period of time, and enables examination of pathways of protein transport [Gosh 1994].

Another method of investigating routes of transport and diffusion velocities is Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) [Schwille 2004]. Here, information is achieved by intensity fluctuations that evolve from single fluorophors excited when passing through the focal volume. Subsequent correlation of the received photon arrival times discloses information on particle concentration as well as the speed of movement. FCS exhibits the disadvantage to be limited to small volumes (*i.e.* the focal volume of a microscope). Larger volumes can only be probed using specialized equipment or having trade-offs in measurement conditions [Peterson 1993; Meinhart 1999; Kuricheti 2004].

This work deals with Diffusion Imaging Microscopy (DIFIM) that has been developed in recent years [Roth 2006]. It allows the detection of intensity fluctuations over a large, mostly several micrometer comprising region. With the implemented Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) it holds the advantage of enabling discrimination of the desired fluorescence signal against perturbing background fluorescence. By means

of these qualifications it is expected that this method enables imaging of diffusion processes and routes of transport respectively. Therefore, Diffusion Imaging Microscopy has been chosen for this work, and its achievement potential aimed to be evaluated using living cells.

Therefore a test system was investigated initially. Here, a dye labeled oligonucleotide was incubated in living cells and hybridized to the polyA-tail of messenger RNA (mRNA). On the basis of this test system it was demonstrated that DIFIM is well applicable to illustrate varying diffusion times over extended cell regions *in vivo*. It is possible to visualize different compartments characterized by varying viscosities or to differentiate different size probes. Additionally it suggests the possibility of displaying modifications and interactions of proteins within the cell. To demonstrate the applicability of DIFIM, the JAK-STAT signalling pathway was investigated using DIFIM. For this, the protein STAT5b (STAT – Signal Transducers and Activators of Transcription), which occurs in its monomeric form in the cytoplasm, was fused to GFP (Green Fluorescent Protein). In the nucleus it exhibits a dimeric structure and activates transcription of DNA. In the first investigations with Diffusion Imaging Microscopy, GFP turned out to be very photolabile and motivated the investigation of more suitable fluorescent markers. These should specifically bind characterized and photostable dyes to the protein of interest.

For this, the so-called *SNAP-Tag* was employed for covalent labeling of a protein to synthetic dyes [Juillerat 2003; Keppler 2004]. The *SNAP-Tag* is a derivative of the human DNA repair protein O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferase (hAGT) situated in the nucleus. It is modified so that it specifically binds *para*-substituted benzyl guanine compounds. It repairs them in a way that an unmodified guanine and a covalent bond between the thiol group of the hAGT and the benzyl ring is obtained. It has the advantage, that it is smaller (~20 kDa) compared to GFP (27 kDa). Therefore it should have less disturbing effects on the protein of interest. Otherwise this alternative of labelling with synthetic dyes provides the possibility to circumvent the commonly unfavourable photophysics of fluorescent proteins. Furthermore, the potential of using the entire visible spectrum for fluorescence measurements can be exploited, because of the missing restriction in the dye choice. For labelling experiments five different dyes in the red spectral range together with high photo stability were tested. Those dyes were coupled to benzyl guanine holding the ability to react with the *SNAP-Tag*. Afterwards cells were incubated with these substrates. After incubation it appeared that, independently of the used cell type, none of the substrates were able to specifically mark the *SNAP-Tag* inside the cell. Following this a smaller reagent (CP) was used in place of BG. It also reacts with the *SNAP-Tag* and holds the chance to be a better transporter

through the cell membrane because of its smaller size and less lipophilic character. The result was that with this substrate the labelling was unspecific as well. No labelling of the *SNAP-Tag* was obtained. Subsequently the usage of transcription reagents, such as Lipofectamine 2000 or Streptolysine O, was examined to overcome the poor membrane permeability. The experiments showed that in the cytoplasm the fluorescence signal remains unspecific. The *SNAP-Tag* within the nucleus was not stained. The dyes showed good interaction with the likewise lipophilic membrane. Therefore they inhibit specific labelling within the cell.

As a second approach the fluorescent protein mCherry, known to be more photostable than the monomeric RFP, and therefore more than GFP as well, was investigated. As mCherry absorbs in the yellow spectral region, a new laser had to be purchased, which allows excitation and investigation of this protein. It was demonstrated that correlation of mCherry is strongly dependent on the incident laser intensity. Thus the fraction of fast fluctuating molecules, *i.e.* the fraction of molecules that alter rapidly between a fluorescent and a non-fluorescent state, increases with the excitation intensity. Additionally increased photo bleaching occurs with higher excitation power. Therefore moderate laser intensities were chosen for subsequent cell experiments. These account for less photo bleaching of mCherry but nevertheless enable the detection of enough photons for significant correlation. After fusion of mCherry to STAT5b and subsequent transfection into living cells the first DIFIM measurements were accomplished and diffusion images were obtained. These obtain heterogeneities in diffusion inside the nucleus as well as in the cytoplasm. Generally slower diffusion is obtained in the nucleus compared to the cytoplasm. This can be explained by interactions of the protein with DNA and/ or other proteins essential for transcription.

Summarizing, it was first demonstrated, that DIFIM is an appropriate method to generate diffusion maps of cells and cellular compartments. DIFIM enables the acquisition of routes of transport information within cells. Furthermore mCherry was found as a prospective fluorescent marker for Diffusion Imaging Microscopy and motivates more precise research into the JAK-STAT signaling pathway. Thus, with the aid of DIFIM, it should be feasible to follow interactions with DNA and other proteins and gain information about nucleocytoplasmic cycling before and after receptor activation. Additionally, a recently purchased injection system provides the chance to inject BG- and CP-substrates, respectively, directly into the nucleus and therefore specifically label the *SNAP-Tag*. Together with other single molecule spectroscopy methods like coincidence analysis, PALM or FRET, and further biological experiments it should be possible to validate mathematical models of signaling pathways and improve these theories. This

DIFIM exhibits great potential to learn more about cellular processes and to investigate their regulation.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN.....	7
2.1. Prinzipien der Fluoreszenzspektroskopie	7
2.1.1. Absorption	7
2.1.2. Emission.....	9
2.1.3. Fluoreszenzquantenausbeute	10
2.1.4. Fluoreszenzlebensdauer	11
2.1.5. Messung von Fluoreszenzlebensdauern	12
2.2. Fluoreszenz-Löschung	14
2.2.1. Dynamische Löschung	15
2.2.2. Statische Löschung	16
2.2.3. Photoinduzierter Elektronentransfer (PET).....	18
2.3. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	20
2.3.1. Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)	22
2.3.2. Bildgebende Diffusionsmikroskopie (DIFIM).....	26
2.4. <i>In vivo</i> Fluoreszenzmarkierung von Proteinen	27
2.4.1. Fluoreszente Proteine	27
2.4.2. SNAP-Tag	29
3. MATERIALIEN UND METHODEN	31
3.1. Chemikalien, Lösungsmittel	31
3.2. Farbstoffe, fluoreszente Proteine	31
3.3. Oligonukleotide	31
3.3.1. Kopplung von NHS-Estern an DNA-Oligonukleotide	32
3.3.2. Bestimmung von Konzentrationen.....	33
3.3.3. Kopplung der BG- und CP-Substrate	33
3.4. Zellkultur	34
3.4.1. Zellkultivierung.....	34
3.4.2. Transfektion der Zellen.....	35
3.5. Standardgeräte	36
3.5.1. HPLC (High Performance Liquid Chromatography).....	36
3.5.2. UV/VIS Spektrometer (Absorptionsmessung).....	36
3.5.3. Fluoreszenz-Spektrometer	37
3.5.4. Fluoreszenzlebensdauer-Spektrometer.....	37
3.6. Einzelmolekülspektroskopie	37
3.6.1. Aufbau des SFLIM-Setups	37
3.6.2. Leica TCS SP5 X.....	43
3.7. Software	43
3.7.1. DAQLinescan (Datenerfassung).....	44
3.7.2. AnaLinescan.....	44
3.7.3. Bildgebende Diffusions-Mikroskopie (DIFIM).....	45
3.7.4. ALV-Karte.....	46

4. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE.....	47
4.1. Bildgebende Diffusions-Mikroskopie (DIFIM)	47
4.2. Einfluss der Integrationszeit und Auflösung auf die Diffusionszeit	56
4.2.1. Einfluss der Integrationszeit.....	56
4.2.2. Einfluss der Auflösung.....	59
4.3. Fluoreszenzmarkierung von Proteinen	61
4.3.1. Auswahl der Farbstoffe und Markierung von Fibroblasten	62
4.3.2. Markierung von Hamsterovarien mit Benzylguanin-Substraten.....	66
4.3.3. Markierung von Hamsterovarien mit Chloropyrimidin-Substraten.....	70
4.4. Markierung von Zellen mithilfe von Transfektionsreagenzien	74
4.4.1. Markierung durch Lipofectamine 2000	74
4.4.2. Markierung mithilfe von Streptolysin O	77
4.5. Fluoreszenzmarkierung mit mCherry	80
4.5.1. Fluoreszenzkorrelations-Spektroskopie mit mCherry	80
4.5.2. Bildgebende Diffusionsmikroskopie mit mCherry in lebenden Zellen	83
5. DISKUSSION UND AUSBLICK.....	88
5.1. Bildgebende Diffusionsmikroskopie (DIFIM)	88
5.2. Fluoreszenzmarkierung mithilfe des <i>SNAP-Tags</i>	91
5.2.1. Fluoreszenzmarkierung mithilfe von Transfektionsreagenzien.....	95
5.3. Bildgebende Diffusionsmikroskopie mit mCherry	96
6. LITERATUR.....	100
7. ANHANG	113
7.1. Abkürzungsverzeichnis	113
7.2. Strukturen der verschiedenen Farbstoffe	115
7.3. Strukturen der verschiedenen Substrate	117
7.4. Übersicht über die Farbstoffmarkierung	117
7.4.1. Inkubation.....	117
7.4.2. Lipofectamine 2000	118
7.4.3. Streptolysin O	119
8. DANKSAGUNG	121

1. EINLEITUNG

Das Forschungsgebiet der Biowissenschaften hat in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. Vor allem im Bereich der Biochemie gab es bahnbrechende Forschungsergebnisse, die es ermöglichen, Proteine in und außerhalb zellulärer Verbände hochspezifisch zu markieren, z. B. durch fluoreszierende Proteine wie GFP [Chalfie 1994; Patterson 2002]. Der Einsatz solcher Marker ermöglicht es, detaillierte Informationen über das Leben auf molekularer Ebene zu erlangen.

Des Weiteren ist eine tiefgreifende Vernetzung naturwissenschaftlicher Disziplinen, wie Biologie, Medizin, Physik und Chemie wichtig. Die Relevanz des wechselseitigen Austauschs zwischen wissenschaftlichen Arbeitsgruppen lässt sich u. a. an der heterogenen Zusammensetzung der Autorengruppen wichtiger Publikationen (Nature, Science etc.) ablesen [Betzig 2006; Rust 2006].

Für die Grundlagenforschung ist es von besonderem Interesse, mithilfe physikalischer Instrumente und chemischer Synthesetechniken biologische Zusammenhänge erkennen und verstehen zu können. Anwendungen finden sich nicht nur in der Wissenschaft [Patterson 2002; Juillerat 2003; Michalet 2005], sondern können auch in kommerziellen Applikationen, z. B. in der Diagnostik [Steinkamp 1984; Greulich 1989; Simone 1998], genutzt werden.

Viele Anwendungen im Bereich der Diagnostik und molekularen Zellbiologie beruhen heutzutage auf Fluoreszenz. Hierfür geeignete synthetische Farbstoffe und fluoreszierende Proteine bilden die Basis für die Erforschung zellulärer Kompartimente und Transportprozesse. Diese Prozesse beruhen häufig auf dem Zusammenspiel weniger Moleküle, die sich mit Methoden der herkömmlichen Optik nicht untersuchen lassen, da ihre Größe und ihre Bewegungen unterhalb der optischen Auflösungsgrenze liegen.

Einen Durchbruch im Bereich der molekularen Forschung stellt die Entwicklung der Einzelmolekülspektroskopie dar, die zuerst durch Hirschfeld im Jahre 1976 beschrieben wurde [Hirschfeld 1976-a]. Ihm gelang es, einzelne Antikörper nachzuweisen, die mit mehreren Farbstoffmolekülen markiert waren. Hierzu war vor allem die Reduzierung des fokalen Volumens und eine zeitlich aufgelöste Detektion notwendig [Hirschfeld 1976-b]. Hirschfeld war es auch, der Photozerstörung als wichtigsten limitierenden Faktor für die Verwendung von Fluorophoren erkannte. Vierzehn Jahre später gelang es Moerner und Orrit unabhängig voneinander, einzelne Fluorophore bei tiefen Temperaturen zu

detektieren [Moerner 1989; Orrit 1990], indem sie Farbstoffe als Dotierungen in einem Festkörper bzw. Kristall nachwies. Dies führte dazu, dass sich die Einzelmolekülspektroskopie zunehmend in der analytischen Chemie, der Materialforschung und den Biowissenschaften etablierte.

Ein wesentlicher Vorteil der Verwendung fluoreszenzbasierter Methoden ist das günstige Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis. Insbesondere die konfokale Mikroskopie hat gegenüber der häufig genutzten Weitfeldmikroskopie den Vorteil, dass sie eine wesentlich höhere Auflösung besitzt, die von der von Abbé postulierten optischen Auflösungsgrenze begrenzt ist. Abbé formulierte, dass die Auflösung zweier Punkte auf einen Abstand beschränkt ist, der etwa der halben eingestrahlten Wellenlänge entspricht. Hierfür sind starke Anregungslichtquellen, bevorzugt Laser, notwendig.

Die Informationen, die mithilfe von Fluoreszenzmessungen an einzelnen Molekülen erhalten werden können, sind nicht auf Intensitätsmessungen beschränkt. Vielmehr ist es möglich, Eigenschaften wie Fluoreszenzlebensdauer [Tinnefeld 2000-a] und Fluoreszenzpolarisation [Ha 1998] oder z. B. die Anzahl einzelner Emitter an einer Stelle in der Probe [Tinnefeld 2002-b] zu bestimmen.

Die Fluoreszenzpolarisation liefert Informationen über die räumliche Orientierung eines Fluorophors. Die Kenntnis der Anzahl einzelner Emitter ermöglicht es, Aussagen über Strukturen unbekannter Systeme zu treffen. Farbstoffe reagieren empfindlich auf die molekulare Umgebung. Dadurch ändern sich die messbaren Parameter Fluoreszenzlebensdauer und Emissionsspektrum. Die Verfolgung der Änderung dieser Fluoreszenzeigenschaften ermöglicht die Aufklärung chemischer Reaktionen oder Dynamiken einzelner Moleküle [Börsch 1998; Korlach 1999].

Diese Änderungen können auf unterschiedlichen Zeitskalen ablaufen: Während frei diffundierende Moleküle über ihre mittlere Aufenthaltsdauer im Fokus (gängigerweise im Bereich von Millisekunden) analysiert werden können, ist es durch Verwendung fixierter Proben möglich, so lange Informationen zu sammeln, bis der Farbstoff photozerstört wird. Dabei werden Beobachtungszeiten von mehreren Sekunden bis Minuten erreicht.

Mithilfe der dieser Arbeit zugrundeliegenden Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie ist es möglich, räumliche und zeitliche Fluoreszenzfluktuationen in femtoliterkleinen fokalen Volumina sichtbar zu machen. Die Erweiterung dieser Methode zur bildgebenden Diffusionsmikroskopie ermöglicht es, Diffusionszeiten über einen größeren Messbereich zu detektieren und Unterschiede von Molekülbewegungen in einem System darzustellen. Erste Ansätze hierzu wurden 1993 von Petersen *et al.* durchgeführt. Ihnen gelang die Kombination von Scanning-FCS (sFCS) mit Laser-Scanning Mikroskopen (LSM). Diese Methode wurde in der Folge als *Image Correlation Spectroscopy* (ICS) bekannt. Sie

eignet sich für die Beobachtung von Diffusionsprozessen im Millisekundenbereich [Petersen 1993], da die Abtastrate geringer als die Änderung der Fluoreszenzfluktuationen sein muss. Gegenüber herkömmlichen konfokalen Messungen geht mit der Methode eine reduzierte Auflösung einher, wodurch die direkte Kombination von räumlicher und dynamischer Information entfällt. Eine Verbesserung wurde erstmals von der Arbeitsgruppe um K. D. Weston publiziert [Kuricheti 2004]. Ihnen gelang es, Geschwindigkeitsprofile in zweidimensionalen Mikrokanälen aufzunehmen, indem sie Strömungsgeschwindigkeiten mithilfe der in jedem Pixel des Bildausschnittes gemessenen Fluoreszenzfluktuationen, berechneten. Die in dieser Arbeit verwendete bildgebende Diffusionsmikroskopie (DIFIM – *Diffusion Imaging Microscopy*) stellt eine Erweiterung dieser Methode mit der bildgebenden Fluoreszenz-Lebensdauer Mikroskopie (FLIM – *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*) dar. Hiermit ist es zusätzlich möglich, die Fluoreszenzlebensdauer zu nutzen, um in Zellen die eigene Hintergrundfluoreszenz von der des markierten Substrates zu diskriminieren. Bei DIFIM werden, in Analogie zum Ansatz von Weston, Fluoreszenzfluktuationen in jedem Pixel gemessen. Dies erlaubt es, auch schnellere Diffusionsprozesse zu erfassen, die mithilfe der sFCS bzw. ICS nicht zugänglich sind. Hierfür ist es notwendig, die Probe punktweise abzutasten, realisierbar durch die sogenannte Objektscanning-Mikroskopie. Diese bietet den Vorteil, Schrittweiten von weniger als 50 nm zu realisieren, ohne die Auflösung, wie im Falle der ICS, zu verringern, wodurch Diffusionsprozesse in einzelnen Zellkompartimenten untersucht werden können. Eine andere Möglichkeit, FCS-Messungen parallel in vielen Punkten einer Probe zu untersuchen, bietet die Untersuchung mittels Weitfeldmikroskopie unter Verwendung einer EMCCD-Kamera [Kannan 2006]. Trotz hoher Empfindlichkeit, die Kameras heutzutage besitzen, ist die Methode (noch) durch die schlechte zeitliche Auflösung der verwendeten Chips beschränkt.

Alle genannten Methoden beruhen auf der Untersuchung fluoreszenter Farbstoffe, die für die Messungen in Zellen selektiv an die zu untersuchende Spezies gebunden werden müssen. Damit die Zelle möglichst wenig „gestört“ wird – für die Biologie ist es von großem Interesse, Zellabläufe unter möglichst physiologischen Bedingungen, d. h. unter *in vivo* Bedingungen zu untersuchen – bedarf es nicht-invasiver Methoden, um den Farbstoff ins Zellinnere zu schleusen. Methoden, wie Mikroinjektion [Peloquin 1997] oder Elektroporation [Benz 1979] fallen aus, da sie einen unmittelbaren Eingriff in den Zellzyklus bedeuten.

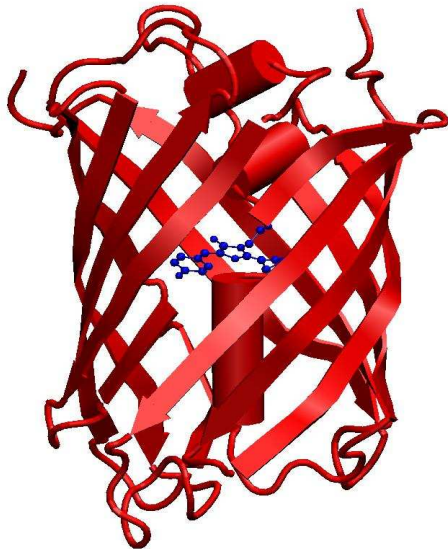


Abbildung 1.1:
Monomer des DsRed (www 1).

Seit der Entdeckung und Isolation des Grün Fluoreszierenden Proteins (GFP) aus der Qualle *aequorea victoria* durch O. Shimomura [Shimomura 1962] und dessen erstmalige Klonierung durch M. Chalfie [Chalfie 1994], die hierfür im Jahr 2008 den Chemienobelpreis zusammen mit R. Y. Tsien verliehen bekamen, ist dieses Protein in der biologischen und medizinischen Forschung ein nicht mehr wegzudenkender Fluoreszenzmarker geworden. Die weitere Forschung führte zur Entdeckung anderer fluoreszierender Proteine [Shaner 2004; Verkhusha 2004]. Mittlerweile sind Proteinvarianten für verschiedene Spektral-

bereiche kloniert worden, die es ermöglichen, Zellstrukturen parallel mit verschiedenen Proteinen zu markieren und gegeneinander abzugrenzen.

Da fluoreszierende Proteine signifikant große Massen (GFP 27 kDa bzw. 238 Aminosäuren) aufweisen, beeinflussen sie innerhalb von Zellen die Proteine, an die sie gebunden sind und erschweren bzw. verlangsamen deren Faltung. Die Folge ist, dass die Proteinfunktionen in einem gewissen Maß gestört werden und der zu untersuchende Prozess möglicherweise nicht mehr oder in anderer Form abläuft.

In den letzten Jahren wurde parallel zur Entwicklung der FP's nach weniger stark beeinflussenden Markern gesucht. Eine vielversprechende Methode, die auf sogenannten *Fusion-Tags* basiert, wurde 1998 in der Gruppe von R. Tsien entwickelt [Griffin 1998; Adams 2002]. Diese beruhen auf einer, im Vergleich zu GFP kleineren, nicht fluoreszenten Rezeptordomäne, die genetisch an das zu untersuchende Protein gebunden und einem kleinen synthetischen, membrangängigen Liganden, der an verschiedene Farbstoffe gekoppelt werden kann. Dieser Ligand besitzt eine geringe Bindungsaffinität in nicht-transfizierten Zellen und ist, solange er noch nicht an das Protein gebunden hat, wenig fluoreszent. Sobald die Bindung an das Protein erfolgt, tritt eine Fluoreszenzverstärkung ein, die es ermöglicht, das Protein mit spektroskopischen Methoden zu untersuchen. Im Falle des Tetracystein-Biarsenical-Tags beruht die Markierung des Proteins auf der Wechselwirkung organischer Arsenverbindungen mit Thiolgruppen. Die Rezeptordomäne (Tag) besteht aus einer Sequenz von sechs Aminosäuren: Vier Cysteine (Tetracystein-Motiv) und zwei beliebige weitere Aminosäuren. Als Fluoreszenzmarker dient mit Arsen-Substituenten modifiziertes

Fluorescein (FIAsH, *Fluorescein Arsenical Helix Binder*, blaue Emission) oder Resorufin (ReAsH, *Resorufin Arsenical Helix Binder*, rote Emission). Ein Nachteil dieser Methode besteht in der erhöhten Hintergrundfluoreszenz, die durch unspezifisch gebundene Diarsenmoleküle hervorgerufen wird. Ein weiteres Manko ist die Toxizität durch unspezifische Bindung an endogene Cysteine, welche durch zusätzliche Substrate, wie 1,2-Ethandiol (EDT) oder 2,3-Dimercaptopropanol (BAL), weitestgehend unterdrückt werden muss. Hierdurch werden endogene Thiolpaare für die Bindung an FIAsH blockiert.

Eine weitere Möglichkeit zur spezifischen Markierung, ist der in der Gruppe von K. Johnsson entwickelte *SNAP-Tag* [Juillerat 2003; Keppler 2004]. Dieser leitet sich von dem humanen Enzym O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (hAGT) ab, welches in Zellen als DNA-Reparaturprotein vorkommt. Der Reparaturmechanismus kann ausgenutzt werden, um synthetische Farbstoffe spezifisch und kovalent an das zu dahingehend modifiziert, dass es spezifisch para-substituierte Benzylguaninverbindungen erkennt und diese „repariert“, sodass anschließend Guanin und eine kovalente Bindung zwischen der Thiolgruppe des hAGT und dem Benzylring resultiert (Abbildung 1.2). Mit dieser Methode ist es außerdem möglich, Farbstoffe auszunutzen, die durch Guanin in ihrer Fluoreszenzemission gelöscht werden [Seidel 1996; Knemeyer 2000; Heinlein 2003, Stöhr 2008]. Somit ist gewährleistet, dass zum einen das Protein selektiv mit dem gewünschten Farbstoff markiert wird, zum anderen die Hintergrundfluoreszenz, die durch unspezifisch gebundenes Substrat entsteht, deutlich verringert werden kann.

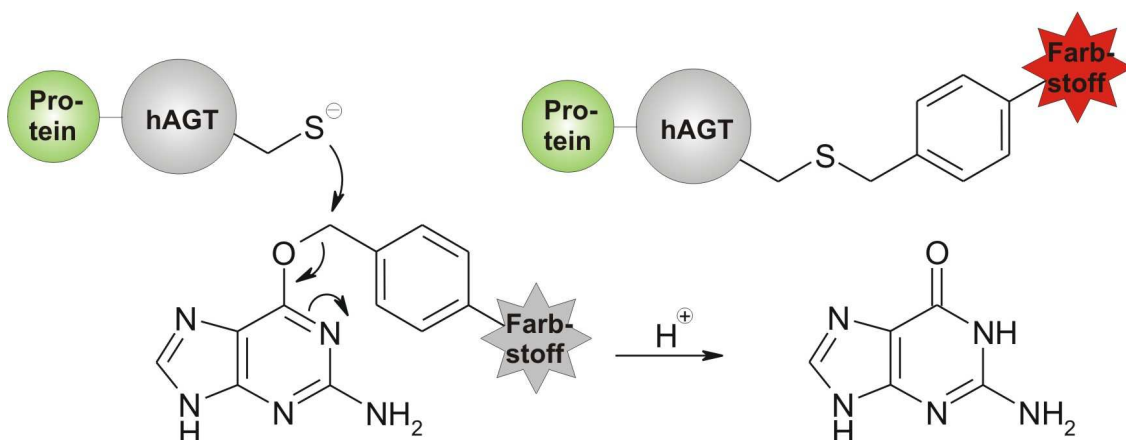


Abbildung 1.2: Mechanismus der Markierung von hAGT-Fusionsproteinen mit synthetischen Benzylguanin-Derivaten.

Ein weiterer Vorteil der Verwendung des *SNAP-Tags*, vor allem in Bezug auf fluoreszente Proteine, ist die, im Vergleich zu GFP, geringere Größe von etwa 20 kDa. Hierdurch wird eine schnellere Faltung der Proteine in ihre native Struktur begünstigt. Zusätzlich ist es möglich, nahezu jeden Farbstoff einzusetzen, wodurch der gesamte Wellenlängenbereich des sichtbaren Spektrums zugänglich wird.

In dieser Arbeit sollte zuerst die bildgebende Diffusionsmikroskopie auf ihre Eignung in lebenden Zellen untersucht werden, um in der Folge den JAK-STAT-Signalweg genauer zu erforschen. Bei den Messungen konnten, aufgrund der geringen Photostabilität des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) keine sinnvollen Diffusionswerte erhalten werden. Deshalb wurde im zweiten Teil dieser Arbeit ein Schwerpunkt auf die Markierung von Proteinen mit in der Einzelmolekülspektroskopie bereits erfolgreich getesteten, synthetischen Farbstoffen gelegt. So wurden vorwiegend Farbstoffe im roten Wellenlängenbereich des sichtbaren Spektrums auf ihre Eignung zur selektiven Markierung des *SNAP-Tags* untersucht. Der rote Bereich wurde deshalb ausgewählt, da hier die Eigenfluoreszenz lebender Zellen geringer ist als z. B. im blauen oder grünen Wellenlängenbereich. Weiterhin wurden Farbstoffe eingesetzt, die über eine hohe Quantenausbeute bzw. hohe Photonenraten verfügen [Schlüter 2004] und damit geeignet sind, dynamische Prozesse mithilfe der bildgebenden Diffusionsmikroskopie in lebenden Zellen zu untersuchen. Da die Farbstoffe im roten Bereich des sichtbaren Spektrums relativ lipophil sind, wurden verschiedene nicht-invasive Methoden erprobt, um die Farbstoffe in das Zellinnere zu schleusen, damit sie an den dort befindlichen *SNAP-Tag* binden können. Hierzu wurden die Transfektionsreagenzien Lipofectamine 2000 und Streptolysin O verwendet, die einerseits Moleküle über Liposome, andererseits durch Löcher, die durch Penetrieren der Membran entstehen, einschleusen.

2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.1. PRINZIPIEN DER FLUORESZENZSPEKTROSKOPIE

Die moderne Spektroskopie erlaubt es, detaillierte Informationen über die Struktur von Atomen und Molekülen zu gewinnen. Durch Wechselwirkung elektromagnetischer Strahlung mit Atomen ist es möglich, die energetischen Eigenschaften der Elektronenhülle zu erforschen und durch Interaktion mit anderen Atomen, Größen wie z. B. Atomabstände in Molekülen und deren Bindungskonstanten zu bestimmen.

2.1.1. Absorption

Die Wechselwirkung zwischen Licht und Materie beruht auf der Resonanz einer elektromagnetischen Lichtwelle mit einem zweiten System (z. B. den Elektronen eines Atoms oder Moleküls), in dem Oszillationen angeregt werden. Im ultravioletten und sichtbaren Wellenlängenbereich (200 – 800 nm) beruhen diese Wechselwirkungen häufig auf elektronischen Übergängen im chromophoren System ungesättigter organischer Verbindungen und liegen im Bereich einiger Elektronenvolt (1 eV entspricht etwa 8000 cm^{-1} bzw. 1250 nm).

Grundlegend müssen Absorptionsspektren von Atomen und Molekülen unterschieden werden. Während ein Atom drei Translationsfreiheitsgrade besitzt und Anregung nur zwischen elektronischen Niveaus erfolgen kann, können in einem Molekül zusätzlich Rotationen und Schwingungen angeregt werden. Folglich besteht ein Atomspektrum aus einer diskreten Linie, wohingegen Molekülspektren aus einer Mischung von elektronischen, Schwingungs- und Rotationsübergängen zusammengesetzt sind.

$$\Delta E = \Delta E_{\text{rot}} + \Delta E_{\text{vib}} + \Delta E_{\text{el}}$$

Aufgrund dieser Vielzahl möglicher Übergänge erscheint ein Molekülspektrum als verbreitertes Bandspektrum. Typische Wellenzahlen für Rotationsübergänge liegen im Bereich von 10 cm^{-1} , für Schwingungsübergänge bei $1\,000 \text{ cm}^{-1}$ und für elektronische Übergänge bei $10\,000 \text{ cm}^{-1}$.

Um ein Elektron aus dem elektronischen Singulettgrundzustand (S_0) in den ersten angeregten Singulettzustand (S_1) anzuheben, muss dieses mit der eingestrahnten Wellenlänge λ in Resonanz treten. Da die Energieniveaus in Atomen quantisiert sind, d. h. nur diskrete Energiewerte annehmen können, gelingt Absorption nur, wenn folgende, von Nils Bohr gefundene Frequenzbedingung erfüllt ist:

$$\Delta E = S_1 - S_0 = h\nu = hc\tilde{\nu}$$

Hierbei stellt h das Plancksche Wirkungsquantum, c die Lichtgeschwindigkeit und $\tilde{\nu}$ die Wellenzahl dar.

Bereits im Jahr 1925 nahm Franck an, dass die Bewegung der Atomkerne beim elektronischen Übergang vernachlässigbar klein ist, da die Absorption elektromagnetischer Strahlung innerhalb von 10^{-15} s erfolgt. Demnach erfolgt der Übergang nach dem Franck-Condon-Prinzip vertikal und es werden bevorzugt höhere Schwingungszustände angeregt, in denen die Überlappung der Aufenthaltswahrscheinlichkeitsmaxima mit denen im Schwingungsgrundzustand am Größten ist (Abbildung 2.1.1).

Die Intensität eines solchen Übergangs berechnet sich aus den beteiligten Schwingungswellenfunktionen des elektronischen Grundzustandes ψ_0 und dem ersten elektronisch angeregten Zustand ψ_1 . Diese ist proportional zum Betragsquadrat des Übergangsdipolmoments:

$$\vec{\mu}_{01} = \int \psi_1^* \vec{\mu} \psi_0 d\tau$$

wobei μ der Operator des elektrischen Dipolmoments ist und ein Maß für die Ladungsumverteilung während des Übergangs darstellt. Damit dieser Übergang quantenmechanisch erlaubt ist, darf das Dipolmoment nicht Null werden. Zusätzlich

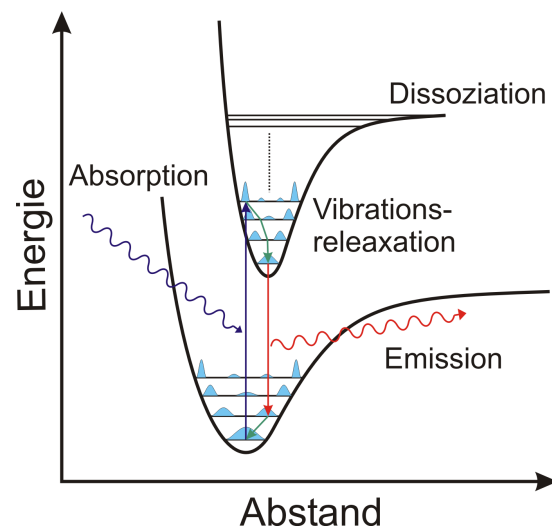


Abbildung 2.1.1: Franck-Condon-Prinzip. Die Kernbewegung ist, im Vergleich zur Anregung elektronischer Niveaus, langsam und führt zu einem vertikalen Übergang; In diesem Fall ist der 0-4-Übergang der Wahrscheinlichste. (Rotations-übergänge sind aus Gründen der Einfachheit vernachlässigt).

muss der elektrische Feldvektor des Lichts parallel zum elektronischen Übergangsmoment des Moleküls liegen.

Beim Durchstrahlen von Licht durch eine Probe nimmt die Intensität der einfallenden Strahlung exponentiell ab. Diese Abhängigkeit wird durch das Lambert-Beersche Gesetz beschrieben:

$$A = \lg \frac{I}{I_0} = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

Hier sind I_0 und I die Intensitäten des eingestrahnten bzw. austretenden Lichtes, A die Absorption, c die Konzentration der Probe, d die Schichtdicke des durchstrahlten Mediums und ε der molare Extinktionskoeffizient. Letzterer ist ein Maß für das Absorptionsvermögen eines Farbstoffes.

2.1.2. Emission

Befindet sich ein Elektron im ersten angeregten elektronischen Zustand, kann es auf mehreren Wegen in den Grundzustand zurückkehren. Einen Überblick über die verschiedenen Möglichkeiten bietet das Jablonski-Diagramm (Abbildung 2.1.2).

Nach der Absorption eines Elektrons befindet sich das Molekül nicht mehr im thermischen Gleichgewicht mit der Umgebung. Wie bereits erwähnt ist der Absorptionsprozess sehr schnell (10^{-15} s) und die Geometrie des Moleküls danach unverändert, d. h. die Kerne befinden sich in derselben Position wie im Grundzustand. Deshalb findet Lichtabsorption in höhere schwingungsangeregte Zustände des ersten angeregten elektronischen Zustandes (S_1) oder sogar in höhere elektronische Niveaus (S_2 , S_3 , etc.) statt. Im Falle einer Anregung höherer elektronischer Singulettzustände erfolgt in $10^{-11} - 10^{-13}$ s interne Umwandlung als strahlungsloser Prozess nach S_1 (Kasha's Regel) [Kasha 1950].

Aus den schwingungsangeregten Zuständen können die Elektronen ihre Energie durch Stöße mit benachbarten Molekülen abgeben und gelangen so in den Schwingungsgrundzustand von S_1 . Diese Schwingungsrelaxation erfolgt typischerweise im Subpikosekundenbereich und findet deshalb vor der Emission eines Photons statt, da der erste angeregte Zustand in der Regel eine Lebensdauer von wenigen Nanosekunden besitzt. Nach der Schwingungsrelaxation erfolgt entweder strahlungslose interne Konversion oder Strahlungsrelaxation in höhere Schwingungsniveaus des elektronischen Grundzustandes S_0 durch spontane Emission eines Fluoreszenzphotons

(k_{fl}). Dieses besitzt eine geringere Energie als das absorbierte Photon, weshalb das Fluoreszenzspektrum im Vergleich zum Absorptionsspektrum bathochrom verschoben ist (Stokes-Shift).

Moleküle können im S_1 -Zustand durch sogenanntes Intersystem Crossing (ISC) in den ersten Triplet-Zustand gelangen. Für die verwendeten Farbstoffe befindet sich der Triplet-Zustand energetisch tiefer als der Singulettzustand. Folglich ist dieser Übergang

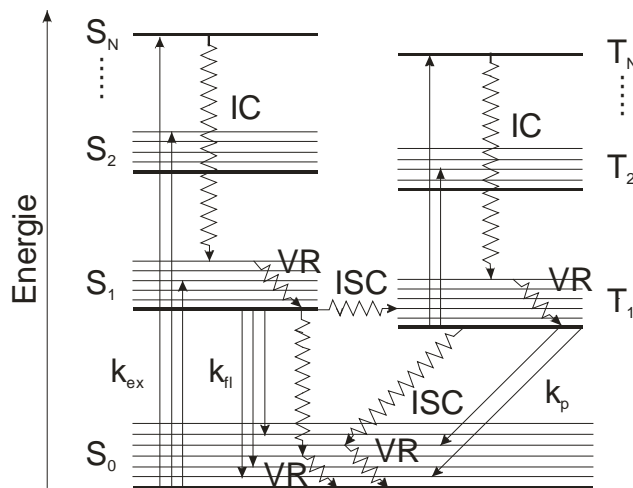


Abbildung 2.1.2: Jablonski-Diagramm.

S und T bezeichnen die jeweiligen Singulett- bzw. Tripletzustände. Die geraden Pfeile bedeuten Absorption bzw. Emission, die gezackten Pfeile strahlungslose Prozesse. IC: Internal Conversion, ISC: InterSystem Crossing, VR: Vibrational Relaxation.

thermodynamisch erlaubt, aber spinverboten. Die Relaxation in den Grundzustand von T_1 erfolgt ebenfalls über strahlungslose Desaktivierung. Der Übergang vom T_1 nach S_0 , der eigentliche Phosphoreszenzübergang, ist ebenfalls spinverboten, und erfolgt mit geringer Wahrscheinlichkeit. Infolgedessen besitzt der Tripletzustand eine relativ lange Lebensdauer im Bereich von Millisekunden bis Sekunden und es ist möglich, eine Anregung in höhere Tripletzustände zu erreichen.

2.1.3. Fluoreszenzquantenausbeute

Die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_f ist ein Maß für die Helligkeit eines Farbstoffmoleküls. Sie ist definiert als Quotient der emittierten und absorbierten Photonen.

$$\Phi_f = \frac{k_f}{k_f + k_{nf}}$$

Es gibt zwei verschiedene Möglichkeiten den ersten angeregten Zustand S_1 zu entvölkern: Die strahlungslose Desaktivierung (k_{nf}) und die Fluoreszenzemission (k_f). Eine Quantenausbeute mit einem Wert nahe 1 bedeutet folglich, dass die Desaktivierung hauptsächlich über Fluoreszenz erfolgt. Die strahlungslosen Desaktivierungsprozesse

spielen in diesem Fall eine untergeordnete Rolle. In der Regel werden Quantenausbeuten relativ zu einem Farbstoff mit einer extrem großen Ausbeute von annähernd 100 % bestimmt.

2.1.4. Fluoreszenzlebensdauer

Der Übergang eines Moleküls von seinem ersten elektronisch angeregten Zustand S_1 zurück in seinen Grundzustand S_0 durch Fluoreszenzemission findet im Nanosekundenbereich (10^{-9} s) statt. Die Fluoreszenzlebensdauer bezeichnet die mittlere Zeit, die sich ein Elektron im ersten angeregten Zustand befindet und ist wie folgt definiert:

$$\tau_{fl} = \frac{1}{k_f + k_{nf}}$$

Die Fluoreszenzemission folgt nach Anregung mit kurzen Lichtpulsen einem exponentiellen Zerfallsgesetz. In den meisten Fällen kann dieses, analog zu radioaktiven Zerfällen, über einen monoexponentiellen Abfall beschrieben werden:

$$I_t = I_0 \cdot \exp(-t/\tau_{fl})$$

wobei I_0 und I_t die Intensitäten zum Zeitpunkt 0 bzw. t darstellen. Die Fluoreszenzlebensdauer wird durch einen Intensitätsabfall von $1/e$ des ursprünglichen Wertes beschrieben.

Häufig, insbesondere bei komplexen biologischen Systemen, werden die Fluoreszenzlebensdauern nicht durch monoexponentielle Abklingkurven beschrieben. In diesen Fällen muss mit der Summe verschiedener Exponentialfunktionen an die Daten angepasst werden:

$$I_t = \sum_i a_i \cdot \exp(-t/\tau_i) \quad \text{mit} \quad \sum_i a_i = 1$$

Hierbei bezeichnet a_i die Amplitude der i -ten Komponente im angeregten Zustand mit der entsprechenden Lebensdauer τ .

Die Fluoreszenzlebensdauer ist für jeden Farbstoff charakteristisch und hängt stark von den äußeren Bedingungen ab. Hierdurch bieten sich für die Fluoreszenzmikroskopie viele weitere optische Untersuchungsmöglichkeiten, wie z. B. die Fluoreszenzlöschung eines Farbstoffes durch Guanosin oder die Unterscheidung der Hintergrundfluoreszenz von der Fluoreszenz des Farbstoffes in der Zelle.

2.1.5. Messung von Fluoreszenzlebensdauern

Die Messung von Fluoreszenzlebensdauern erfolgen sowohl über Phasenmodulation, als auch durch zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen (TCSPC, *Time-Correlated Single-Photon Counting*) [Connor 1984]. In diesem Abschnitt soll letztere Möglichkeit näher erläutert werden.

Die Messung mittels TCSPC basiert auf der Detektion einzelner Photonen und deren Registrierung der Photonenankunftszeiten am Detektor in Beziehung zum Laserpuls. Diese Ankunftszeiten werden in einem Histogramm aufsummiert (Abbildung 2.1.3). Um Mehrfachdetektion zu umgehen, d. h. Vermeidung von Fluoreszenzsignalen aus dem jeweiligen vorhergehenden Pulszyklus, muss der Abstand zweier aufeinanderfolgender Pulse etwa das Fünffache der zu messenden Lebensdauer betragen. Die Detektionswahrscheinlichkeit sollte einen Wert von 5 % nicht überschreiten, um sogenannte „*pile-up*“-Effekte zu vermeiden, die durch versehentliches Auftreten mehrerer Photonen innerhalb eines Anregungszyklus zustande kommen. Hohe Anzahlen detektierter Photonen pro Laserpuls sollten vermieden werden, da jeweils nur das erste Photon pro Puls detektiert werden kann und dazu führt, dass die Fluoreszenzlebensdauern künstlich verkürzt werden. Durch Betrachtung einer hohen

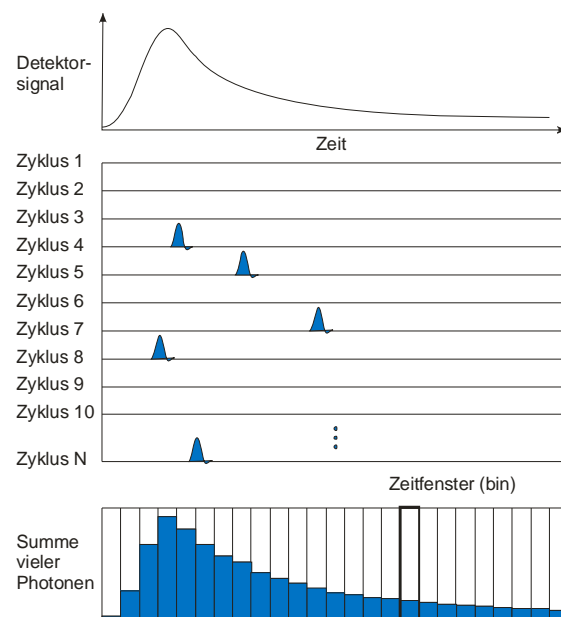


Abbildung 2.1.3: Prinzip der TCSPC-Messung. Die Photonenankunftszeiten werden aufsummiert und über Entfaltung der Wellenfunktion wird die Fluoreszenzlebensdauer erhalten.

Zyklenzahl und Aufsummieren der Zeitdifferenzen wird eine Fluoreszenzabklingkurve erhalten. Diese Methode ist aufgrund der Genauigkeit der Zeitmessung sehr exakt und wird nicht durch die Breite des Detektorpulses beeinflusst. Daher ist die Auflösung um einiges besser als bei Verwendung eines analogen Signalerfassungsgerätes.

Die Histogramme können durch verschiedene Methoden analysiert werden, von denen der „Least-Square“-Ansatz (LS) und der „Maximum Likelihood Estimator“ (MLE) die bekanntesten sind. Für eine geringe Anzahl Photonen, wie es bei Einzelmolekülmessungen häufig der Fall ist, erscheint die Methode des MLE als am besten geeignet [Tellinghuisen 1993; Soper 1994; Maus 2001]. Allerdings gilt dieser nur für monoexponentielle Fluoreszenzzerfälle, welche die meisten freien Farbstoffe in Lösung zeigen. Mehrexponentielles Fluoreszenzabklingverhalten kann z. B. bei Farbstoffgemischen oder bei photoinduziertem Elektronentransfer (PET) beobachtet werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Farbstoffe waren an DNA-Oligonukleotide oder Proteine gekoppelt, die im Allgemeinen ein mehrexponentielles Abklingverhalten zeigen. Für die Analyse von Einzelmoleküllebensdauern werden häufig zu wenige Photonenergebnisse für einen brauchbaren multiexponentiellen Fit detektiert. In diesem Fall ist es möglich, mit einer „mittleren“ Lebensdauer zu rechnen, wenn sich die einzelnen Lebensdauern nicht zu sehr unterscheiden. Die Fluoreszenzlebensdauer wurde in dieser Arbeit hauptsächlich verwendet, die Autofluoreszenz von Zellen vom Signal der Farbstoffe zu unterscheiden. Für die Einzelmolekülmessungen wurde ausschließlich ein MLE verwendet, der auf folgender Gleichung basiert:

$$1 + \left(e^{-T/\tau} - 1 \right)^{-1} - m \left(e^{-mT/\tau} - 1 \right)^{-1} = N^{-1} \sum_{i=1}^m i \cdot N_i$$

wobei T die Breite des Messfensters beschreibt, m die Anzahl verwendeter Zeitfenster (bins), N die in Betracht kommende Anzahl Photonenergebnisse und N_i die Anzahl Photonenergebnisse im Zeitfenster i. Die Lebensdauer kann dann unter Verwendung des Newton-Algorithmus numerisch bestimmt werden.

2.2. FLUORESCENZ-LÖSCHUNG

Wie bereits in Kapitel 1.1.2. erwähnt, gibt es verschiedene molekulare Wechselwirkungen, die den ersten angeregten Zustand strahlungslos depopulieren und damit die Fluoreszenzintensität verringern und die -lebensdauer beeinflussen. Diese Prozesse werden allgemein als Fluoreszenzlöschung (*engl. quenching*) bezeichnet. In Tabelle 2.2.1 sind verschiedene Mechanismen aufgezeigt [Lakowicz 1999]:

Elektronentransfer	$F^* + Q$	\rightarrow	$F^{+/-} + Q^{-/+}$
Energietransfer	$F^* + Q$	\rightarrow	$F + Q^*$
Exciplex-Bildung	$F^* + Q$	\rightarrow	$(F Q)^*$
Protonen-Transfer	$F^* + HB$	\rightarrow	$FH^+ + B^-$

Tabelle 2.2.1: Übersicht über die verschiedenen Löschmechanismen eines Farbstoffmoleküls (F^*) aus dem ersten angeregten Zustand S_1 , Q: Quencher (Löschmolekül).

Fluoreszenzlöschung kann dann erfolgen, wenn sich der Farbstoff und das Löschmolekül während der Verweilzeit im angeregten Zustand auf einen für die Löschung notwendigen Abstand nahe kommen. Für diese bimolekulare Reaktion ist die Abnahme der Fluoreszenzintensität $I(t)$ mit der Zeit bei Anwesenheit der Löschmoleküle Q durch folgende Gleichung gegeben:

$$I_t = I_0 \cdot e^{-(k+k_q[Q])t}$$

wobei k die Summe der einzelnen Geschwindigkeitskonstanten k_f , k_{IC} und k_{ISC} der Desaktivierung des angeregten Zustandes und k_q die bimolekulare Löschkonstante darstellt. Die Fluoreszenzlebensdauer τ kann berechnet werden über:

$$\tau = \frac{1}{k + k_q[Q]}$$

Für die Analyse der Kinetik dieser bimolekularen Reaktion wird angenommen, dass die Löschmolekülkonzentration $[Q]$ viel größer als die des sich im angeregten Zustand befindlichen Fluorophors $[F^*]$ ist ($[Q] \gg [F^*]$). Folglich reduziert sich die Kinetik zweiter Ordnung auf eine Kinetik pseudo-erster Ordnung, da die Konzentration der Löschmoleküle als zeitlich konstant angenommen werden kann.

Der Elektronentransfer beruht auf einer Redoxreaktion im angeregten Zustand. Hier ist weder ein Stoßkontakt notwendig, noch wird Energie durch eine chemische Reaktion ausgetauscht. Die Geschwindigkeit der Reaktion ist ausschließlich durch die Redoxpotentiale, den Abstand und die Lage der Reaktionspartner zueinander bestimmt. Beim Energietransfer handelt es sich um eine Dipol-Dipol-Wechselwirkung, bei der die Anregungsenergie strahlungslos vom Farbstoffmolekül F^* auf ein geeignetes Löschmolekül Q (Quencher) übertragen wird. Damit ein solcher Energieübertrag erfolgen kann, muss das Fluoreszenzspektrum des Farbstoffes mit dem Absorptionsspektrum des Quenchers überlappen [Förster 1948; Stryer 1978].

Bei der Exiplex-Bildung (*excited charge-transfer complex*) handelt es sich um einen Spezialfall des Elektronentransfers. Hier wird eine Molekülverbindung $(FQ)^*$ gebildet, die ausschließlich im angeregten Zustand stabil ist, und nach Abgabe der Energie wieder zerfällt.

Befinden sich im Fluorophor acide Protonen, ist es möglich, diese durch eine Säure-Base Reaktion zu übertragen. Dies wird durch Änderungen der pK_a -Werte des Fluorophors im angeregten Zustand möglich.

2.2.1. Dynamische Löschung

Die dynamische Löschung, auch Stoßlöschung genannt, beruht auf der Wechselwirkung des angeregten Farbstoff- und des Löschmoleküls. Hierfür ist es notwendig, dass sich während der Existenz des angeregten Zustandes ein Komplex aus Fluorophor und Löschmolekül bildet, wobei der Energieübertrag dann über einen der im vorigen Kapitel erwähnten Mechanismen, z. B. Exiplex-Bildung oder Protonentransfer, erfolgt. Nach der Stoßlöschung geht sowohl der Farbstoff als auch das Löschmolekül unter Verringerung der Fluoreszenzintensität und der Fluoreszenzlebensdauer in den elektronischen Grundzustand über (Abbildung 2.2.1).

Die dynamische Löschung wird durch die klassische Stern-Volmer-Gleichung beschrieben:

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \cdot \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q]$$

In dieser Gleichung bezeichnen F_0 bzw. τ_0 und F bzw. τ die Fluoreszenzintensität bzw. -lebensdauer in Ab- und Anwesenheit des Löschmoleküls, k_q die bimolekulare Löschkonstante und K_D die Stern-Volmer-Konstante.

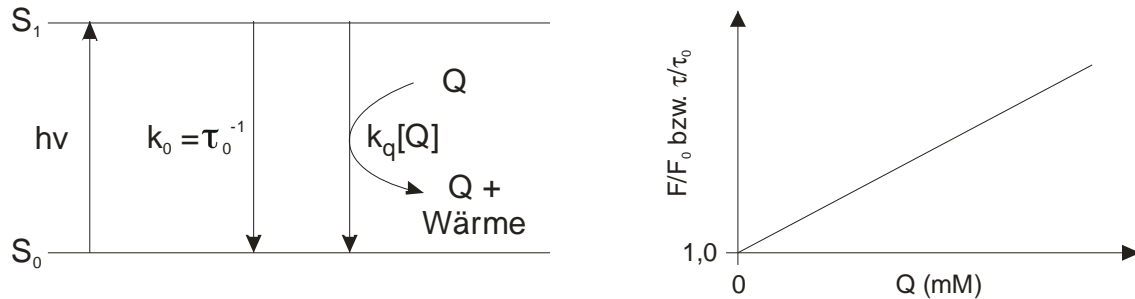


Abbildung 2.2.1: Links: Prinzip der dynamischen Löschung eines angeregten Fluoreszenzfarbstoffes im S_1 durch ein Löschmolek\u00fcl Q . Rechts: Beispiel eines Stern-Volmer-Diagramms. Aufgetragen ist hier die relative Fluoreszenzintensit\u00e4t F_0/F bzw. die relative Fluoreszenzlebensdauer τ_0/τ gegen die L\u00f6schmolek\u00fclkonzentration $[Q]$.

F\u00fcr die Bestimmung der bimolekularen, dynamischen L\u00f6schkonstante k_q wird die Fluoreszenzintensit\u00e4t bzw. die Fluoreszenzlebensdauer in Abh\u00e4ngigkeit von der Quencherkonzentration $[Q]$ gemessen und aufgetragen (Abbildung 2.2.1), wobei sich bei rein dynamischer L\u00f6schung eine Gerade ergibt. Die Stern-Volmer-Konstante K_D entspricht der Geradensteigung. H\u00e4ufig tritt jedoch eine progressive Abweichung von der Geraden auf, die durch zus\u00e4tzliche statische L\u00f6schung erkl\u00e4rt werden kann.

2.2.2. Statische L\u00f6schung

Quenching kann wie im Falle der dynamischen L\u00f6schung nicht nur durch Zusammenst\u00f6\u00dfe zwischen Farbstoff- und L\u00f6schmolek\u00fclen im angeregten Zustand erfolgen, sondern auch durch Bildung eines nicht- oder nur sehr schwach fluoreszierenden Komplexes zwischen Quencher und Fluorophor. Absorbiert dieser Licht, kehrt er sofort und ohne Aussendung eines Photons wieder in den Grundzustand zur\u00fcck (Abbildung 2.2.2). Im Gegensatz zur dynamischen L\u00f6schung, ist diese statische L\u00f6schung nicht zeitabh\u00e4ngig, d. h. hier \u00e4ndert sich die Fluoreszenzlebensdauer nicht.

Die Abh\u00e4ngigkeit der Fluoreszenzintensit\u00e4t von der Quencherkonzentration $[Q]$ kann relativ einfach unter Betrachtung der thermodynamischen Gleichgewichtskonstanten K_S f\u00fcr die Komplexbildung erhalten werden:

$$K_s = \frac{[F-Q]}{[F][Q]}$$

wobei $[F-Q]$ die Konzentration des Komplexes darstellt, und $[F]$ bzw. $[Q]$ die jeweiligen Konzentrationen des nichtkomplexierten Farbstoffes bzw. Löschmoleküls sind.

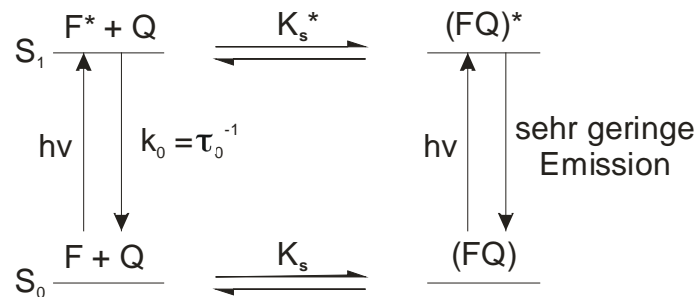


Abbildung 2.2.2: Prinzip der statischen Fluoreszenzlöschung durch Bildung eines nichtfluoreszierenden Komplexes im Grundzustand.

Ist der Komplex nicht fluoreszent, ergibt sich der verbleibende Fluoreszenzanteil F_0/F , aus dem Bruchteil der nichtkomplexierten Fluorophore. Mit Hilfe der Gesamtfarbstoffkonzentration $[F]_0$ wird folgender Zusammenhang erhalten:

$$\text{mit } [F]_0 = [F] + [F-Q]$$

$$\Rightarrow K_s = \frac{[F]_0 - [F]}{[F][Q]} = \frac{[F]_0}{[F][Q]} - \frac{1}{[Q]}$$

Aus diesem kann die statische Stern-Volmer-Gleichung hergeleitet werden:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_s [Q]$$

Die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität F_0/F von der Löschmolekülkonzentration $[Q]$ ist, wie auch im Falle der dynamischen Löschung, linear. Für das Verhältnis der Fluoreszenzlebensdauern gilt: $\tau_0/\tau = 1$. Die Messung der Lebensdauern ist daher eine gute Möglichkeit zwischen statischer und dynamischer Löschung zu unterscheiden.

Wie bereits erwähnt verläuft die Löschung häufig nicht über einen einzelnen Mechanismus. So kommt es vor, dass sowohl Stoßlöschung als auch Komplexbildung stattfindet. Ist dies der Fall, gilt folgende modifizierte Stern-Volmer-Gleichung:

$$\frac{F_0}{F} = (1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot [Q]) \cdot (1 + K_S \cdot [Q]) = \frac{\tau_0}{\tau} \cdot (1 + K_S \cdot [Q])$$

Aufgrund der nun quadratischen Abhängigkeit der Löschmolekülkonzentration, wird eine progressive Abweichung der Geraden erhalten.

2.2.3. Photoinduzierter Elektronentransfer (PET)

Befindet sich ein Molekül in seinem ersten angeregten Zustand, kann es aufgrund seiner veränderten Redox-Eigenschaften als besserer Elektronen-Donor oder –Akzeptor fungieren, als ob es sich im elektronischen Grundzustand befinden würde. Durch Absorption eines Photons geht ein Elektron aus dem HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital*) in das LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) über und hinterlässt so ein Elektronenloch im HOMO. Im LUMO befindet sich ein, dem Energiebetrag des Übergangs $E_{0,0}$ entsprechend, energiereicheres Elektron und das Molekül ist leicht zu oxidieren oder zu reduzieren. Die Übergangsenergie $E_{0,0}$ entspricht der Energie zwischen den Schwingungsgrundzuständen $v_0=0$ und $v_1=0$ und kann über Mittelung der Energien des Absorptions- und Fluoreszenzspektrums bestimmt werden [Grabowski 1976].

Befindet sich das Molekül im Grundzustand, muss zur Oxidation die Ionisierungsenergie IP aufgewendet werden, die um den Betrag der Anregungsenergie größer ist, als die Ionisierungsenergie IP^* im angeregten Zustand. Die Elektronenaffinität, d. h. die Energie, die bei Aufnahme eines Elektrons frei wird, ist im angeregten Zustand größer. Ein Molekül kann in Gegenwart eines Elektronendonors reduziert oder durch einen Elektronenakzeptor oxidiert werden (Abbildung 2.2.3), wobei sich die jeweiligen Redox-Eigenschaften wie folgt zusammensetzen:

$$\text{Oxidation} \quad E_{\text{Ox}} = E_{\text{Ox}}^0 - \Delta E$$

$$\text{Reduktion:} \quad E_{\text{Red}} = E_{\text{Red}}^0 - \Delta E$$

wobei E_{Ox} und E_{Red} die Oxidations- bzw. Reduktionsenergie im Grundzustand und ΔE die Übergangsenergie darstellen.

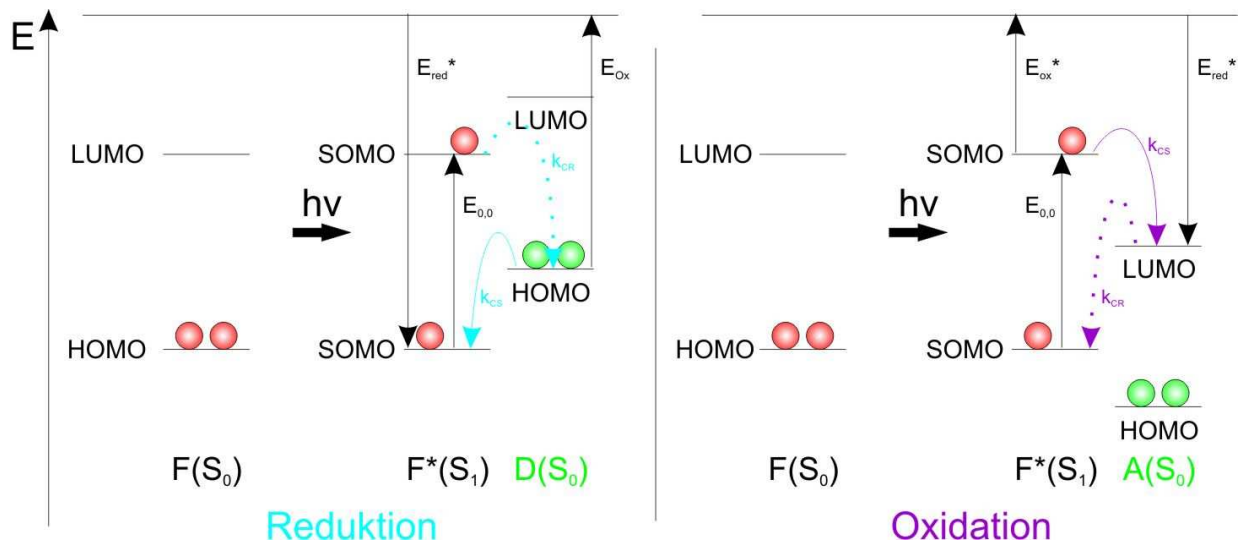


Abbildung 2.2.3: Energieschema für den photoinduzierten Elektronentransfer zwischen einem Molekül im angeregten Zustand und einem Donor (Reduktion des Farbstoffes) bzw. Akzeptor (Oxidation des Farbstoffes).

Ob eine Reaktion stattfindet bzw. energetisch begünstigt wird, kann aus der freien Standardreaktionsenthalpie ΔG^0 bestimmt werden. Diese kann aus den Oxidations- (E_{Ox}) und Reduktionspotentialen (E_{Red}), der Übergangsenergie $E_{0,0}$ und dem Coulomb-Potential ΔG_{Coul} abgeschätzt werden. Werden die Lösungsversuche im gleichen Medium durchgeführt wie bei der Bestimmung der Redoxpotentiale, können die Solvatationsenthalpien der Radikationenpaare vernachlässigt werden und die freie Reaktionsenthalpie berechnet sich nach der klassischen Rehm-Weller-Gleichung [Rehm 1969, Weller 1982]:

$$\Delta G_{Coul} = E_{Ox} - E_{Red} - E_{0,0} + \Delta G_{Coul}$$

mit

$$\Delta G_{Coul}^0 = -\frac{e^2}{\epsilon_s \cdot R_C}$$

Der Coulomb-Term beschreibt die Abstandsabhängigkeit des photoinduzierten Elektronentransfers ($\sim 1/R_C$), wobei R_C der Abstand der beiden Zentren und ϵ_s die Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels darstellen.

2.3. KONFOKALE FLUORESCENZMIKROSKOPIE

Die konfokale Fluoreszenzmikroskopie hat als Mikroskopiemethode in den 70er und 80er Jahren in der Biologie bzw. Zellbiologie eine zentrale Bedeutung erlangt. Sie wurde erstmals Anfang der Neunziger Jahre dazu genutzt, einzelne Moleküle sichtbar zu machen [Rigler 1992]. Diese, bis dahin rein physikalisch genutzte Technik, bietet gegenüber der konventionellen Weitfeld-Mikroskopie diverse Vorteile, wie z. B. die Möglichkeit die Hintergrundfluoreszenz durch Reduzierung des fokalen Volumens erheblich zu unterdrücken. Seither gewinnt diese Methode immer mehr an Bedeutung, vor allem im Bereich der Biologie und Biochemie, da es damit möglich ist, einzelne Moleküle bei Raumtemperatur und unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen [Weiss 1999]. Durch die Entwicklung verschiedener Techniken, wie der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) oder des Förster-Resonanz-Energietransfers (FRET) sind sehr viele weitere Parameter zugänglich, die gemeinsam dazu beitragen, die komplexen Zusammenhänge zellulärer Strukturen zu verstehen.

In der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie wird ein Laserstrahl durch ein Objektiv mit hoher Apertur zu einem Fokus kollimiert, der in der Größenordnung der Auflösungsgrenze liegt [Pawley 1995]. Das Fluoreszenzlicht wird durch das gleiche Objektiv gesammelt und über einen dichroitischen Strahlteiler vom Anregungslicht spektral getrennt. In der Bildebene des Mikroskops wird das Fluoreszenzsignal, das nicht aus der Fokusebene stammt, durch eine Lochblende (typischerweise zwischen 50 und 200 μm Durchmesser) im Detektionspfad ausgeblendet. Mit dieser Anordnung gelingt es, ein etwa einen Femtoliter großes Beobachtungsvolumen zu realisieren, mit dem es möglich ist, die Fluoreszenz einzelner Moleküle zu detektieren [Eggeling 2001]. Diese wird über geeignete Detektoren, wie z. B. Lawinenphotodioden (APD, *Avalanche Photo Diodes*) oder Photonenvervielfacher (PMT, *Photo Multiplier Tubes*) detektiert. In Abbildung 2.3.1 ist das Prinzip eines konfokalen Mikroskops dargestellt.

Die Auflösung eines Mikroskops ist als der minimale Abstand definiert, den zwei Punkte haben dürfen, um noch als zwei Punkte wahrgenommen zu werden. Durch Betrachtung der Abbildung eines infinitesimal kleinen Punktes in einer zweidimensionalen Projektion wird deutlich, dass diese nicht durch einen sehr kleinen Punkt, sondern durch einen Kreis, eine sogenannte „*Airy Disc*“ (Airy Scheibe) wiedergegeben wird. Diese besteht aus einem intensiven Signal in der Mitte und sich abwechselnden hellen und dunklen Ringen (Nebenmaxima) um dieses Zentrum herum.

Die Auflösungsgrenze dieses Mikroskops berechnet sich durch den von Abbé um 1870 gefundenen Zusammenhang

$$d_{\min} = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha} = \frac{\lambda}{2NA}$$

wobei n der Brechungsindex des Immersionsmediums, α der halbe Öffnungswinkel des Objektivs, NA die numerische Apertur des Objektivs und λ die Wellenlänge des Lichts bezeichnen.

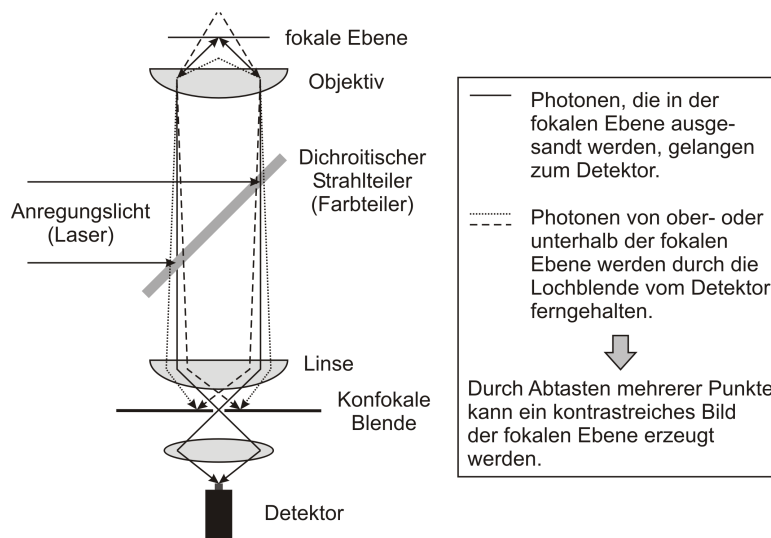


Abbildung 2.3.1: Prinzip eines konfokalen Mikroskops.

Das Prinzip der konfokalen Mikroskopie findet mittlerweile eine sehr breite Anwendung, vor allem im biologischen Bereich. Die Untersuchung biomolekularer Systeme erfolgt hier über Abbildung und zeitaufgelöste Messungen einzelner Fluorophore oder Halbleiterpartikel, sogenannte *Quantum Dots* [Kelley 2001, Michalet 2001]. Durch die Entwicklung hochpräziser Piezo-Verschieber und der Verfügbarkeit schneller Computerprozessoren ist es möglich, eine Vielzahl, voneinander unabhängiger Fluoreszenzparameter aufzunehmen, wie beispielsweise Intensität, spektrale Charakteristik, Fluoreszenzlebensdauer, Position oder Molekülfuktuationen. In dieser Arbeit wurde ein auf SFLIM (*Spectrally Resolved Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*) basierender konfokaler Aufbau verwendet [Tinnefeld 2002-a], der es durch die parallele Datenerfassung mehrerer Parameter und der speziellen Auswertesoftware ermöglicht, sowohl die Position, als auch die zugehörige Diffusionszeit in lebenden Zellen zu veranschaulichen.

2.3.1. Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)

Die Fluoreszenzkorrelations-Spektroskopie (FCS, *Fluorescence Correlation Spectroscopy*) wurde erstmal von Madge, Elson und Webb dazu genutzt, Diffusion und chemische Reaktionskinetiken von DNA-Interkalationsfarbstoffen zu untersuchen [Madge 1972; Madge 1974]. Bis heute entwickelte sich die FCS zu einer weit verbreiteten Technik, die es ermöglicht z. B. molekulare Diffusionsprozesse, Partikelkonzentrationen und Konformationsdynamiken sowohl in sehr verdünnten Lösungen und Strömungssystemen, als auch in zellulären Umgebungen zu analysieren. Die ersten Erfolge von Madge *et al.* wurden von einem sehr schlechten Signal-zu-Hintergrund Verhältnis in den Messungen begleitet. Insbesondere waren schlechte Detektionseffizienzen, zu hohe Konzentrationen und schlechte Hintergrundunterdrückung die Ursachen der Probleme. Der Durchbruch gelang durch die Implementierung von FCS in die konfokale Mikroskopie, bei der nur wenige Moleküle im konfokalen Volumen angeregt werden, sowie durch den Einbau einer Lochblende, die zusätzlich das Hintergrundsignal reduziert [Rigler 1990]. So konnten die anfänglich langen Aufnahmezeiten im Bereich mehrerer Minuten auf wenige Sekunden reduziert werden [Webb 2001].

In der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie werden zeitlich hochaufgelöste Fluoreszenzintensitätsspuren aufgenommen und dann mit, um die Differenz τ , zeitlich versetzten Kopien ihrer selbst korreliert. Die daraus resultierende Autokorrelationsfunktion ist ein Maß für die Selbstähnlichkeit eines Zeitsignals und berechnet sich wie folgt:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} = \frac{\langle F(t) \cdot F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} - 1 \quad \text{mit} \quad \delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$$

Hierbei ist $F(t)$ die Fluoreszenz zum Zeitpunkt t und $F(t + \tau)$ die zum Zeitpunkt $t + \tau$. Die spitzen Klammern kennzeichnen eine Mittelung aller Werte über die Zeit t . Die Fluoreszenzfluktuation $\delta F(t)$ spiegelt im zeitlichen Mittel die Anzahl der Moleküle wieder, die durch das fokale Volumen diffundieren. Diese Fluktuationen können durch verschiedene Phänomene hervorgerufen werden. Eine Möglichkeit sind Helligkeitsveränderungen der einzelnen Fluorophore, die z. B. durch photophysikalische Vorgänge zustande kommen, wie Intersystem-Crossing, Änderungen der Quantenausbeute durch Löschung oder durch Verschiebungen in den Absorptions- und

Emissionsspektren durch Konformationsänderungen. Zusätzlich können Konzentrationsänderungen der Fluorophore ein Grund für Fluktuationen sein.

Kommen alle Fluktuationen durch Änderungen der lokalen Konzentration δC im effektiven Anregungsvolumen V_{eff} des Fokus zustande, berechnet sich δF wie folgt [Schwille 2004]:

$$\delta F(t) = \kappa \int_V W(\underline{r}) \cdot I_0 \cdot \delta(\sigma \cdot q \cdot C(\underline{r}, t)) \cdot dV$$

wobei $W(r)$ die räumliche Verteilung des Emissionslichts, I_0 die Anregungsintensität und $\delta(\sigma q C(r,t))$ die Fluorophordynamik auf Einzelmolekülebene beschreibt – mit

$\delta \sigma$	Fluktuationen im Absorptionsquerschnitt
δq	Fluktuationen der Quantenausbeute
$\delta C(\underline{r}, t)$	Fluktuationen der lokalen Teilchenkonzentration zur Zeit t , durch z. B. Brown'sche Bewegung

Hiermit, und mit der Beziehung zwischen der lateralen Diffusionszeit τ_D und dem Diffusionskoeffizienten D , ist es möglich, das effektive fokale Volumen V_{eff} zu berechnen.

$$\text{mit } \tau_D = \frac{r_0^2}{4 \cdot D} \quad \rightarrow \quad V_{\text{eff}} = \frac{\left(\int W(\underline{r}) dV \right)^2}{\int W^2(\underline{r}) dV} = \pi^{\frac{3}{2}} \cdot r_0^2 \cdot z_0$$

Die dreidimensionale Autokorrelationsfunktion für einen Fluorophor, welcher durch das fokale Volumen diffundiert, kann dann wie folgt berechnet werden:

$$G(\tau) = \frac{1}{V_{\text{eff}} \langle C \rangle} \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{r_0}{z_0} \right)^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_D}}}$$

Der erste Quotient gibt die mittlere Anzahl Moleküle N im fokalen Volumen an, d. h. die Amplitude ist invers proportional zur Konzentration. Dies ist einfach dadurch zu erklären, dass der Ein- und Austritt von Molekülen in das fokale Volumen bei geringer Konzentration zu stärkerer Fluktuation führt als bei höherer Teilchenanzahl.

Sind die Parameter r_0 und z_0 (Anregungsvolumen als Rotationsellipsoid, r_0 und z_0 jeweils Abstand vom Mittelpunkt) durch z. B. Kalibrationsmessungen bekannt, ist es möglich die

Konzentration der Fluorophore nahezu exakt durch die Amplitude $G(0)$ der Autokorrelationsfunktion zu bestimmen [Eigen 1994; Schwille 1997].

$$G(0) = \frac{1}{\langle N \rangle} = \frac{1}{V_{\text{eff}} \cdot \langle C \rangle}$$

Der Diffusionskoeffizient kann aus der charakteristischen Abklingzeit τ_D der Autokorrelationsfunktion nach obiger Gleichung hergeleitet werden [Rigler 1993], wobei gilt:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h}$$

k bezeichnet hier die Boltzmann-Konstante, T die Temperatur und η die Viskosität. Der hydrodynamische Radius (R_h) ist proportional zur dritten Wurzel des Teilchenvolumens, das wiederum proportional zur Masse und damit zum Molekulargewicht ist. Dies ist der Grund, weshalb nur dann eine messbare Veränderung der Diffusionszeit zu finden ist, wenn eine drastische Veränderung des Molekulargewichtes einhergeht. Der Quotient r_0/z_0 (häufig auch als k bezeichnet) wird Strukturparameter genannt und liegt für die in dieser Arbeit verwendete Apparatur bei acht.

Für die Berechnung wurde angenommen, dass sich die Fluoreszenzeigenschaften des Fluorophors während dem Durchtritt durch das fokale Volumen nicht verändern ($d(\sigma \cdot q) = 0$). Dies trifft für die meisten Farbstoffe und höheren Anregungsleistungen nicht immer zu. Eine häufige Ursache hierfür ist der Übergang in den ersten angeregten Triplettzustand. Dieses *Intersystem Crossing* ist quantenmechanisch verboten und die Relaxation in den Grundzustand ist entsprechend lang. Während dieser Zeit kann der Farbstoff kein Fluoreszenzphoton aussenden und bleibt „dunkel“. Um dies in der Korrelationsfunktion zu berücksichtigen, muss die Funktion um einen Triplett-Term erweitert werden [Widengren 1995]. Damit kann die Autokorrelation wie folgt beschrieben werden:

$$G(\tau) = \frac{1}{V_{\text{eff}} \langle C \rangle} \cdot \frac{(1 - T + T \cdot e^{-\frac{\tau}{\tau_{\text{Tripl}}}})}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{r_0}{z_0}\right)^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_D}}}$$

T bezeichnet den relativen Anteil der Moleküle im Triplettzustand. Diese Teilchen fluoreszieren nicht und die Konzentration scheint geringer zu sein, was wiederum in einer höheren Amplitude erkennbar ist. τ_{Tripl} beschreibt schnelle Fluktuationen, die durch den Übergang in den Triplett-Term entstehen. Dieser liegt normalerweise bei 1-2 μs , während der Wert für die Diffusionszeit τ_D , je nach Viskosität der Probe und der Molekularmasse im Bereich zwischen 20 μs und mehreren Millisekunden liegt.

Je nach Situation in der Probe können diverse Modelle für die Autokorrelation entwickelt und gefittet werden. So existieren sowohl Modelle für 2D-Diffusion z. B. in Membranen [Schwille 1999], Transport in gerichteten Strömen [Kuricheti 2004], als auch für anomale Diffusion, wie z. B. in Zellen [Weiss 2004].

Für die Auswertung mittels Bildgebender Diffusionsmikroskopie (siehe nachfolgendes Kapitel) wurden zweidimensionale Modell-Funktionen verwendet.

$$G(\tau) = \frac{1}{V_{\text{eff}} \langle C \rangle} \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)}$$

Die mithilfe dieser Funktion gewonnenen Diffusionszeiten unterscheiden sich nicht wesentlich von denen, durch dreidimensionale Fitanpassung gewonnenen Daten (Abbildung 2.3.1).

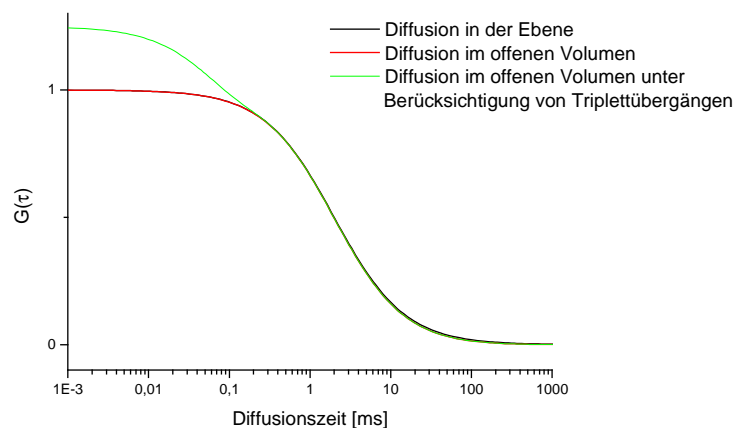


Abbildung 2.3.2: Mit Vergleich der Modellfunktionen der Diffusion in der Ebene (2D, schwarz), im offenen Volumen (3D, rot) und im offenen Volumen unter Berücksichtigung von Triplett-Übergängen (3D/Triplett, grün). Als Parameter wurde eine Diffusionszeit von 2 ms angenommen, der Formparameter k des fokalen Volumens betrug 0,125. Für die Triplettamplitude wurde ein Wert von 0,2, für die Triplettlebensdauer ein Wert von 50 μs angenommen.

Durch Verwendung photolabiler Farbstoffe, wie z. B. GFP, kommt es häufig zur Bestimmung einer verkürzten Diffusionszeit [Widengren 1996, Eggeling 1998]. Dies liegt

darin begründet, dass der Farbstoff beim Durchtritt durch das fokale Volumen photoebleicht wird und folglich während seiner weiteren Diffusion durch das fokale Volumen nichtfluoreszent vorliegt. Die gemessene Fluoreszenzzeit ist somit kürzer, als die reale Durchtrittszeit durch das Anregungsvolumen.

Durch die Autokorrelation wird das gemessene Signal mit sich selbst zu einem späteren Zeitpunkt verglichen. Häufig ist es so, dass bei einer solchen Autokorrelation Artefakte im Bereich weniger Mikrosekunden auftauchen, die auf sogenanntes „*afterpulsing*“, d. h. Nachpulsen der Detektoren zurückzuführen sind [Zhao 2003]. Des Weiteren können Intensitätsschwankungen der Anregungslichtquelle auftreten. Mithilfe der Kreuzkorrelation, bei der zwei verschiedene Signale derselben Probe miteinander korreliert werden, können diese herausgerechnet und gleichzeitig der Hintergrund reduziert werden. So ist es möglich ein Maß für die gegenseitige Beeinflussung („*cross-talk*“) beider Signale zu bekommen.

2.3.2. Bildgebende Diffusionsmikroskopie (DIFIM)

Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie erlaubt es, Aussagen über Konzentrationen und Diffusionsprozesse in Lösung oder zellulärer Umgebung zu machen. Allerdings sind die gewonnenen Ergebnisse sehr lokal, da ausschließlich örtlich begrenzte Informationen geliefert bzw. Fluktuationen in einem sehr kleinen Volumenelement betrachtet werden können. In den letzten Jahren stieg das Interesse der Biologie diese Informationen mit hochauflösenden und bildgebenden Techniken, wie z. B. der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie (CLSM - *Confocal Laser Scanning Microscopy*) zu vereinen. Diese neue Technik wurde mittels verschiedener Ansätze verwirklicht. Die *Scanning-FCS*-Methode (sFCS) wurde in den 70er Jahren erstmals von Weissmann *et al.* dazu genutzt Molekulargewichte von Makromolekülen durch Messung der spontanen Konzentrationsänderungen zu bestimmen [Weissmann 1976]. Später wurde die Methode des Scanning-FCS mit konfokalen Mikroskopen (CLSM) kombiniert [Petersen 1993], sodass zusätzlich zu zeitlichen Informationen auch räumliche hinzukamen. Diese Methode (ICS- *Image Correlation Spectroscopy*) eignet sich für relativ langsame Diffusionsprozesse, die im Bereich von Millisekunden ablaufen, da die Abtastrate schneller als der Diffusionsprozess sein muss. Dies ist z. B. bei Transmembranproteinen bzw. bei Diffusion in der Membran der Fall. Allerdings wird bei ICS eine geringere Auflösung erreicht als bei herkömmlicher Konfokalmikroskopie. Eine Möglichkeit die Ortsauflösung mit der entsprechenden Dynamik zu verbinden wurde

2004 durch Kuricheti et al [Kuricheti 2004] verwirklicht. Ihnen gelang es, Geschwindigkeitsprofile in Mikrokanälen aufzunehmen und damit zweidimensionale Geschwindigkeitskarten zu erhalten, die bis dahin über bildgebende Partikel-Geschwindigkeitsmessungen (PIV – *Particle Image Velocimetry*) zugänglich waren [Meinhart 1999].

Die vor kurzem entwickelte Methode der Bildgebenden Diffusionsmikroskopie (DIFIM-*Diffusion Imaging Microscopy*) [Roth 2006; Roth 2007] kombiniert die FCS mit SFLIM. Mit dieser ist es möglich, gleichzeitig Fluoreszenzlebensdauern zu bestimmen und das Signal der Farbstoffe vom Hintergrundsignal der Zellen zu trennen. Die Probe wird hierzu über Objektscanning (Aufbau s. Kap. 3.6.1) abgetastet und erlaubt es für jeden einzelnen Bildpunkt eine Korrelation zu berechnen. Damit können auch schnelle Diffusionszeiten erfasst werden, die z. B. über ICS bzw. ICM nicht zugänglich sind. Ein weiterer Vorteil gegenüber dem Laserscanning ist die Möglichkeit kleinere Schrittweiten verwenden zu können und so eine höhere Auflösung zu bekommen. Somit ist es u. a. möglich, Unterschiede in der Diffusion sogar in Zellkompartimenten untersuchen zu können. DIFIM ermöglicht es, Unterschiede in Diffusionszeiten sichtbar zu machen.

2.4. IN VIVO FLUORESCENZMARKIERUNG VON PROTEINEN

2.4.1. Fluoreszente Proteine

Die Entdeckung des Grünfluoreszierenden Proteins (GFP, *Green Fluorescent Protein*) aus dem *aequorea victoria* [Shimomura 1962] und dessen Verwendung als genetisch kodierte Fluoreszenzmarkierung [Prasher 1992; Chalfie 1994] leitete eine neue Ära von Fluoreszenzmarkern für die biologische Forschung ein. Seither wurde eine Vielzahl weiterer fluoreszierender Proteine gefunden, die den sichtbaren Bereich des Spektrums abdecken [Tsien 1998; Baird 2000]. Diese Proteine besitzen den großen Vorteil, dass sie direkt an das zu untersuchende Protein fusioniert werden können und häufig nur wenig störende Effekte auf die eigentliche Proteinfunktion hervorrufen. Das empfiehlt sie vor allem für *in vivo* Messungen, da sie nicht toxisch für die Zellen sind und eine aufwendige, meist invasive Markierung der Zellen entfällt.



Abbildung 2.4.1:
Aequorea victoria [www2].

Der Nachteil dieser fluoreszierenden Proteine besteht in ihrer - verglichen mit organischen Farbstoffen - geringen Quantenausbeute und photophysikalischen Labilität. Ein weiterer Nachteil ist die Größe. So ist GFP mit 27 kDa (238 Aminosäuren) etwa genauso groß, wie die zu untersuchenden Proteine. Dies kann zur Beeinträchtigung der Proteinfunktion oder zur Hemmung der Expression führen. Um die photophysikalischen Eigenschaften zu verbessern, wurden in den letzten Jahren eine Vielzahl weiterer

GFP-Mutanten entwickelt [Zhang 2002]. Auch im gelben und roten Fluoreszenzbereich wurden einige Proteine gefunden, wie z. B. die YFP-Mutante Citrine [Griesbeck 2001] und die RFP-Mutanten Ds-Red [Matz 1999] sowie mRFP1 [Campbell 2002]. Diese zeichnen sich durch eine verringerte pH-Abhängigkeit und verbesserte Photostabilität aus. 2004 konnten weitere, sich von mRFP1 ableitende, und vom gelben (mHoneydew) bis in den dunkelroten Bereich des Spektrums gehende (mPlum), fluoreszente Proteine entwickelt werden [Shaner 2004]. Von diesen, als „mFruits“ bezeichneten Proteinen, wird mCherry als das Überlegendste für Fluoreszenzmessungen erachtet [Shaner 2005]. Aus diesem Grund wurde es in dieser Arbeit verwendet. Einen Überblick über deren Eigenschaften gibt Tabelle 2.4.1.

Protein	Organismus	Absorption (λ_{exc})	Emission λ_{em}
Green Fluorescent Protein (GFP)	Aequorea victoria	475	508
DsRed	Discosoma	558	583
Yellow Fluorescent Protein (YFP)	GFP Mutante	514	527
Red Fluorescent Protein (mRFP1)	DsRed Monomer	584	607
mCherry	mRFP Mutante	587	610

Tabelle 2.4.1: Überblick über einige fluoreszierende Proteine und deren spektroskopische Eigenschaften.

2.4.2. SNAP-Tag

Ein weiterer Ansatz zur Markierung von Proteinen besteht in der *in vivo*-Markierung von Fusionsproteinen mit synthetischen Farbstoffen. Hierfür muss gewährleistet sein, dass der Farbstoff nur an das gewünschte, entsprechend modifizierte Protein binden kann und unspezifische Reaktionen innerhalb der Zelle unterbunden werden. Hierfür gibt es verschiedene Ansätze: *Halo-Tag* [Los 2005], *SNAP-Tag* [Keppler 2004] und Tetracystein-Biarsenical Tag [Gaietta 2002]. Im Folgenden soll der in dieser Arbeit verwendete *SNAP-Tag* näher erläutert werden.

Der *SNAP-Tag* leitet sich von dem humanen Protein O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (hAGT) ab. Die eigentliche Funktion des hAGT liegt in der Reparatur von O⁶-alkylierten Guaninen innerhalb der DNA und erfolgt durch die irreversible Übertragung einer Alkylgruppe auf ein Cystein des hAGT (Abbildung 2.4.1). Da die Reaktion wenig spezifisch ist, können anstelle der alkylierten DNA ebensogut O⁶-Benzylguanin (BG's) verwendet werden. Diese können beispielsweise durch einen Farbstoff oder Biotin in para-Position so modifiziert werden, dass durch Reaktion mit dem reaktiven Cystein eine kovalente Bindung des Fusionsproteins mit der gewünschten Markierung erreicht wird (Thioetherbindung). Hierdurch ist es möglich, wissenschaftlich interessante Fusionsproteine in lebenden Säugerzellen oder Bakterien mit den gewünschten, zumeist photostabileren Fluorophoren zu markieren [Damoiseaux 2001; Juillerat 2003; Keppler 2003].

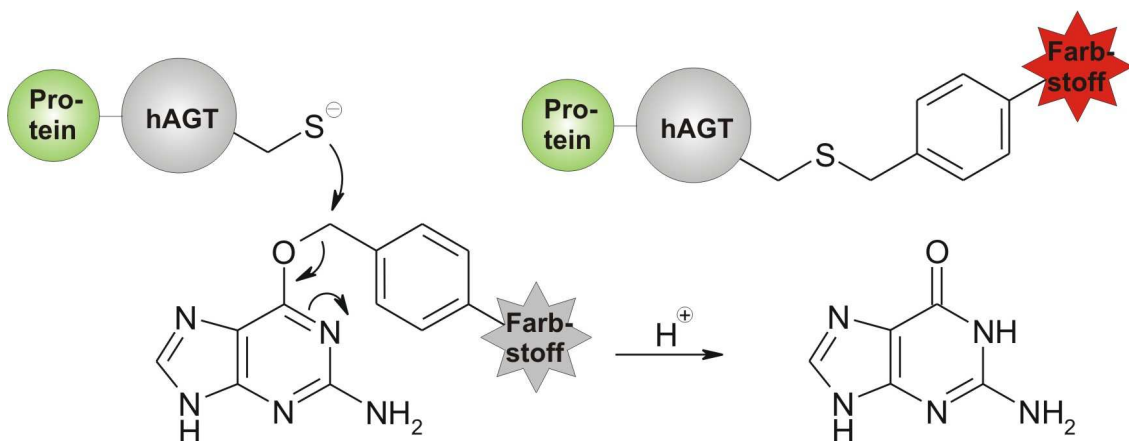


Abbildung 2.4.2: Mechanismus der Markierung von hAGT-Fusionsproteinen mit synthetischen Benzylguanin-Derivaten. Hier der Mechanismus der Markierung mit einem durch Guanin gelöschten Farbstoff, wie z. B. MR 121.

Diese Markierungsmethode beruht demnach auf zwei verschiedenen Teilschritten. Zum einen muss das entsprechende Fusionsprotein kloniert und in der Zelle exprimiert

werden. Zum anderen muss das gewünschte Farbstoff-O⁶-Benzylguanin-Substrat hergestellt und in der Zelle zur Reaktion mit dem hAGT gebracht werden. Hierfür werden die zellgängigen Substrate inkubiert und die Zellen anschließend mehrmals mit Medium gewaschen, um überschüssiges Substrat herauszuwaschen. Bei *E. coli*-Stämmen ist dies durch Abzentrifugieren deutlich einfacher möglich als bei Säugerzellen. Bei diesen ist dieser Waschschrift zeitaufwendig und hinterlässt Spuren unspezifischer Hintergrundfluoreszenz. Eine Möglichkeit dies zu umgehen, besteht in der Ausnutzung der Löscheigenschaften von Guanin auf verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe (s. Kap. 2.2.3). Sind diese an Benzylguanin gekoppelt ist der Farbstoff durch die räumliche Nähe zum Guanin zunächst fluoreszenzgelöscht. Erst durch die kovalente Bindung an hAGT wird Guanin entfernt und der Farbstoff beginnt zu fluoreszieren. Hierdurch ist es möglich unspezifischen Hintergrund ohne viel Aufwand zu reduzieren [Stöhr 2008; Sieberg 2009].

Ein weiterer Vorteil der Markierung von Proteinen mit dem *SNAP-Tag* liegt, neben der viel größeren Auswahl an zumeist viel photostabileren Farbstoffen und der Möglichkeit durch Guanin gelöschte Fluorophore einzusetzen, in der Größe. So ist das hAGT mit 20 kDA kleiner als GFP oder andere fluoreszierende Proteine und stört zelluläre Prozesse weniger.

3. MATERIALIEN UND METHODEN

3.1. CHEMIKALIEN, LÖSUNGSMITTEL

Die in dieser Arbeit verwendeten Lösungsmittel, Puffer und Chemikalien wurden, soweit nicht anders erwähnt, von der Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland) bezogen. Die Chemikalien wurden in p. a. Qualität verwendet und sämtliche Lösungen und Verdünnungen wurden mit doppeldestilliertem Wasser hergestellt.

3.2. FARBSTOFFE, FLUORESZENTE PROTEINE

Die in dieser Arbeit verwendeten Farbstoffe wurden bei verschiedenen Firmen bezogen. Die Farbstoffe Atto 488, Atto 565, Atto 620, Atto 633, Atto 647N und Atto 655 wurden als NHS-Ester bei der Firma Atto-Tec GmbH (Siegen, Deutschland) bestellt. MR 121 wurde freundlicherweise von Prof. K.H. Drexhage (Universität-Gesamthochschule, Siegen, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Der Farbstoff Cy 5 wurde bei der Firma GE Healthcare (München, Deutschland) bestellt. Dy 505 wurde bei der Firma Dyomics GmbH (Jena, Deutschland) bezogen und dessen Derivat Carboxyrhodamin 110 (CarbRhodh110) wurde bei der Firma Biotrend (BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland) bestellt.

Die fluoreszenten Proteine wurden als Fusionsproteine über Kooperationspartner bezogen. STAT5-GFP und STAT5-mCherry wurden in der Arbeitsgruppe von PD Dr. U. Klingmüller und Dr. A. Pfeifer kloniert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Arbeiten mit Kcv-GFP bzw. Kcv-mRFP wurden in enger Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. G. Thiel durchgeführt und die Fusionsproteine durch Dipl. Biol. J. Hewing bereitgestellt.

3.3. OLIGONUKLEOTIDE

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden bei der Firma IBA GmbH (Göttingen, Deutschland) synthetisiert. Um eine Kopplung an verschiedene Farbstoffe zu ermöglichen, wurden diese am 5'-Ende mit einem C₆-Amino-Linker modifiziert.

Das für die DIFIM-Messungen verwendete Oligonukleotid bestand aus 20 Thymidineinheiten, bei dem im Phosphatrest ein nichtverbrücktes Sauerstoffatom durch ein Schwefelatom ersetzt wurde.

Oligo	Sequenz 5' → 3'
dT ₂₀	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT

Tabelle 3.3.1: Für DIFIM-Experimente verwendete DNA-Sequenz.

3.3.1. Kopplung von NHS-Estern an DNA-Oligonukleotide

Um die Aminfunktion der Oligonukleotide am 5'-Ende zu koppeln wurden Farbstoffe mit einer, durch N-Hydroxy-Succinimidyl (NHS) aktivierten Carboxylgruppe eingesetzt. Die Farbstoffe wurden bereits aktiviert beim Hersteller bestellt. In Abbildung 3.3.1 ist die Reaktion der Oligonukleotid-Kopplung dargestellt.

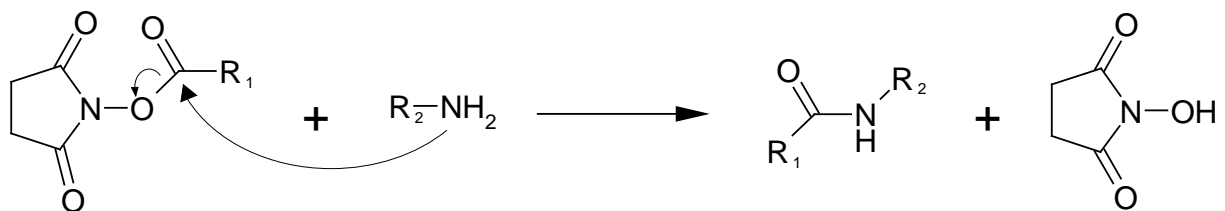


Abbildung 3.3.1: Kopplung der aminofunktionalisierten Oligonukleotide mit den NHS-Estern der Farbstoffe.

Das freie Elektronenpaar der Aminfunktion des Oligonukleotids kann in einer nukleophilen Substitution an der, durch einen NHS-Ester aktivierten Carboxylgruppe des Farbstoffes angreifen. Hierbei entsteht eine Peptidbindung zwischen dem Farbstoff und dem Oligonukleotid. Diese Reaktion wird durch schwach basische Bedingungen begünstigt. Die Reaktion wurde daher in 200 mM Carbonat-Puffer bei einem pH-Wert von 8,5 durchgeführt. Der Farbstoff wurde in einem dreifachen Mol-Überschuss eingesetzt. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend chromatographisch per HPLC aufgereinigt.

3.3.2. Bestimmung von Konzentrationen

Die Konzentration der gekoppelten Oligonukleotide wurde mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes über die Absorption bei 260 nm bestimmt. Der Extinktionskoeffizient ϵ_{Oligo} der Oligonukleotide wurde durch Aufsummieren der einzelnen Extinktionskoeffizienten der Basen berechnet, wobei n_b die Anzahl der Basen b innerhalb einer Sequenz bezeichnet und ϵ_b den Extinktionskoeffizienten der entsprechenden Base bei 260 nm.

$$\epsilon_{\text{Oligo},260} = \sum_{b=A,T,G,C} n_b \cdot \epsilon_{b,260}$$

$$\epsilon_{\text{Adenin},260} = 15\,400 \text{ l/mol} \cdot \text{cm}$$

$$\epsilon_{\text{Thymin},260} = 8\,800 \text{ l/mol} \cdot \text{cm}$$

$$\epsilon_{\text{Guanin},260} = 11\,700 \text{ l/mol} \cdot \text{cm}$$

$$\epsilon_{\text{Cytosin},260} = 7\,300 \text{ l/mol} \cdot \text{cm}$$

Farbstoffe besitzen bei 260 nm ebenfalls eine Absorption, die zumeist zwischen 5-50 % des Absorptionsmaximums liegt. Dieser Wert muss bei der Konzentrationsberechnung berücksichtigt werden.

3.3.3. Kopplung der BG- und CP-Substrate

Aminofunktionalisiertes O⁶-Benzylguanin (BG-NH₂) und 4-(4-(aminomethyl)benzyloxy)-6-chloropyrimidin-2-amin (CP-NH₂) wurden von der Covalys Biosciences AG (Witterswil, Schweiz) bezogen (Abbildung 3.3.2) und sind in der Lage mit dem *SNAP-Tag* zu reagieren. Zur Herstellung der Farbstoffkonjugate wurden die aktivierten Farbstoffe mit der Aminfunktion des BG's bzw. CP's umgesetzt.

Die Reaktion erfolgte in DMF analog der Kopplung mit den Oligonukleotiden (Abbildung 3.3.1). Hierzu wurden 100 μl BG (0,5 mg/ml) bzw. 40 μl CP (2 mg/ml) mit jeweils 10-15 μl des Farbstoff-NHS-Esters (2 mg/ml) über Nacht geschüttelt und anschließend über HPLC aufgereinigt. Als Katalysator wurden 2 μl Diisopropylethylamin (DIPEA) zugegeben.

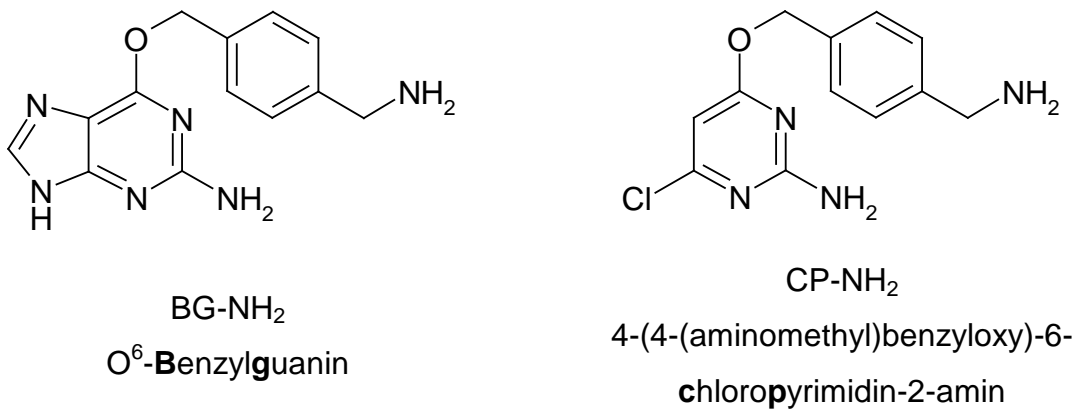


Abbildung 3.3.2: Struktur von BG und CP.

3.4. ZELLKULTUR

Die in dieser Arbeit verwendeten Fibroblasten (NIH 3T3 *Swiss Mouse Embryo*) wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) bezogen. Die eingesetzten Hamsterovarien (CHO, *Chinese Hamster Ovary*), die stabil mit dem AGT-Histon 2B transfiziert waren, wurden freundlicherweise von der Firma Covalys (Witterswill, Schweiz) zur Verfügung gestellt.

Die Zellen wurde in einem *Hera cell*[®] 150-Inkubator der Firma Thermo Electron Corporation (Langenselbold, Deutschland) bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert. Zur Probenvorbereitung und Kultivierung der Zellen wurde eine Sterilbank *Hera safe* der gleichen Firma verwendet.

3.4.1. Zellkultivierung

Die NIH-3T3-Zellen wurden in phenolrotfreiem DMEM (DUBLECCO'S MEM) Medium der Firma Biochrom AG (Berlin, Deutschland) mit 10 % Kälberserum (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 25 mM HEPES-Puffer, 100 units/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin und 3 mM L-Glutamin (alle Biochrom AG) kultiviert. Die Kultivierung der CHO-Zellen erfolgte in Nutrient Mixture F-12 Ham (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) mit 10 % fötalem Kälberserum (FBS, Biochrom AG), 25 mM HEPES-Puffer, 100 units/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin und 3 mM L-Glutamin.

Zum Vereinzeln (Splitten) der Zellen, wurde die etwa 70 % konfluente Kultur zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin LE Express (Invitrogen) abgelöst. Die Zellen wurden in Medium aufgenommen und bei 200 g fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet erneut in Medium aufgenommen. Die Zellen wurden in der Regel in einer 1:10 Verdünnung in T-25 Gewebekulturflaschen gesät.

Für die Reaktionen mit den Oligonukleotiden bzw. BG- und CP-Substraten wurden die Zellen ein bis zwei Tage vor der Messung in Lab-Tek™ Chambered Coverglas, 8-well (Nunc, Langensfeld, Deutschland) bzw. μ -slides, 8-well, ibidi treat (ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland) gesät, sodass sie für die Messung zu etwa 40 % konfluent waren. Sollten Messungen mit Lipofectamin 2000 (Invitrogen) durchgeführt werden, wurden die Zellen in Medium ohne Antibiotika gesetzt. Die Gesamtlösungsmenge betrug jeweils 200 μ l pro Kammer.

3.4.2. Transfektion der Zellen

Die Transfektion der Zellen erfolgte über verschiedenen Reagenzien.

Die Oligonukleotide wurden zum einen mittels Inkubation über zwei Stunden in die Zellen geschleust. Hierzu wurde das farbstoffmarkierte DNA-Oligonukleotid in der gewünschten Konzentration in das Zellmedium gegeben und nach zwei Stunden bei 37 °C zweimal mit warmem Medium gewaschen. Zum anderen wurde das Oligonukleotid über Lipofectamine 2000 (Invitrogen) in die Zellen gebracht. Hierbei wurde pro 8-well Kammer (0,8 cm² Fläche) 1 μ l Lipofectamine 2000 mit 49 μ l Medium ohne Serum gemischt. Nach 5 Minuten wurde die gewünschte Menge Oligonukleotid (ebenfalls auf 50 μ l aufgefüllt) zugegeben und nach weiteren 20 Minuten erfolgte die Zugabe zu den Zellen.

Die Reaktion mit den BG- und CP-Substraten erfolgte über drei verschiedene Wege: reine Inkubation, Transfektion über Lipofectamine 2000 und Streptolysin O (SLO). Die Substrate wurden jeweils in einer 1 μ M Konzentration zugegeben. Die Inkubation erfolgte wiederum während zwei Stunden, wie auch die Transfektion über Lipofectamine 2000 (s. o.). Die Transfektion mittels Streptolysin O geschah während 30 Minuten. Hierzu wurde ein Aliquot SLO (1 μ l pro 8-well Kammer) sowie die Substrate auf die adhärenen Zellen gegeben. Nach 30 Minuten wurden die Zellen zweimal mit Medium gewaschen und zum Ausheilen für weitere 90 Minuten in den Inkubator gestellt. Vor der Messung wurde das Medium ein weiteres Mal gewechselt.

3.5. STANDARDGERÄTE

3.5.1. HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Die Probenaufreinigung erfolgte an einer HPLC-Anlage der Firma Agilent (Waldbronn, Deutschland, 1100 series), die für Stoffmengen bis zu 5 nmol geeignet ist. Als Säule diente eine Reversed-Phase-Säule der Firma Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland) mit 250 mm Länge und einem Innendurchmesser von 4,6 mm, die mit Oktadecylsilan-Hypersil C18 (Korngröße 5 μm) gepackt war.

Als Laufmittel A diente eine wässrige 0,1 M Triethylammoniumacetat-Lösung (TEAA, pH 7,4). Als Laufmittel B wurde eine 0,1 M TEAA-Lösung in 25 % Wasser und 75 % Acetonitril verwendet. Die beiden Laufmittel wurden über einen linearen Gradienten (siehe Tabelle 3.5.1) mit der Zeit variiert.

Zeit	Fluss	Eluent
0 min	1 ml/min	100 % Laufmittel A, 0 % Laufmittel B
30 min	1 ml/min	0 % Laufmittel A, 100 % Laufmittel B

Tabelle 3.5.1: Lösungsmittelgradient der HPLC-Aufreinigung.

Bei hydrophilen Proben wurde als Laufmittel A eine 0,1 %ige wässrige Trifluoressigsäure-Lösung (TFA) verwendet. Als Laufmittel B diente ein Gemisch aus 25 % Wasser und 75 % Acetonitril mit 0,1 % TFA.

Während der Aufreinigung wurde die Absorption sowohl bei 260 nm, sowie bei den entsprechenden Absorptionsmaxima der eingesetzten Farbstoffe bestimmt. Die Fluoreszenzdetektion erfolgte am Emissionsmaximum.

3.5.2. UV/VIS Spektrometer (Absorptionsmessung)

Die Absorptionsspektren wurden mit einem Cary 500 Spektrometer der Firma Varian (Darmstadt, Deutschland) aufgenommen. Die Messung selbst erfolgte in SuprasilTM-Quarzglas-Halbmikroküvetten der Firma Hellma (Müllheim, Deutschland). Die Konzentration sollte 10^{-6} mol/l nicht übersteigen um die Linearität des Signals, die durch das Lambert-Beersche Gesetz gegeben ist, zu gewährleisten.

3.5.3. Fluoreszenz-Spektrometer

Fluoreszenzspektren wurden mit einem Cary Eclipse Fluoreszenzspektrometer der Firma Varian (Darmstadt) durchgeführt. Als Küvetten wurden ebenfalls SuprasilTM-Quarzglas-Halbmikroküvetten der Firma Hellma benutzt. Die Anregung erfolgte jeweils am Absorptionsmaximum der Farbstoffe.

3.5.4. Fluoreszenzlebensdauer-Spektrometer

Die Ensemble-Fluoreszenzlebensdauern der verschiedenen Substrate wurden an einem FluoTime 100 Compact Spektrometer der Firma Picoquant (Berlin, Deutschland) durch zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen (TCSPC, Time-Correlated Single Photon Counting) bestimmt. Als Lichtquellen dienten Leuchtdioden (LED's, Light Emitting Diode) folgender Wellenlängen: 450 nm, 500 nm und 600 nm. Die Detektion erfolgte über einen Photonenvervielfacher (PMT, *Photo Multiplier Tube*).

Die Anregung erfolgte mit einer Repetitionsrate von 20 MHz und einer Pulslänge von 200 ps (Halbwertsbreite). Um den "pile-up" Effekt zu vermeiden (Kapitel 2.1.5) wurden nur Proben mit einer Konzentration von 10^{-7} mol/l gemessen. Zunächst wurde über die Lichtstreuung die Instrumentenfunktion gemessen und anschließend mit der erhaltenen Abklingkurve gefaltet. Dies wurde durch die mitgelieferte Software FluoFit v4.0 (Picoquant) direkt übernommen. Zur Überprüfung der Anpassungsgüte (*engl. goodness of fit*), wurde die Prüfgröße χ^2 ausgegeben, deren Wert optimalerweise 1 annehmen sollte.

3.6. EINZELMOLEKÜLSPEKTROSKOPIE

3.6.1. Aufbau des SFLIM-Setups

Der Großteil der Messungen in dieser Arbeit wurde auf Einzelmolekülniveau durchgeführt. Das Setup hierfür basiert auf einem konfokalen Scanning Mikroskop, bei dem die Anregung über Laser drei verschiedener Wellenlängen erfolgte [Herten, 2000]. Dieser Aufbau bietet die Möglichkeit, die spektrale und zeitliche Information einzelner Photonen zu detektieren und diese anschließend über entsprechende Softwareanalyse

bildgebend zu verarbeiten. Ein vereinfachtes Schema des verwendeten Aufbau ist in Abbildung 1.6.1 gezeigt.

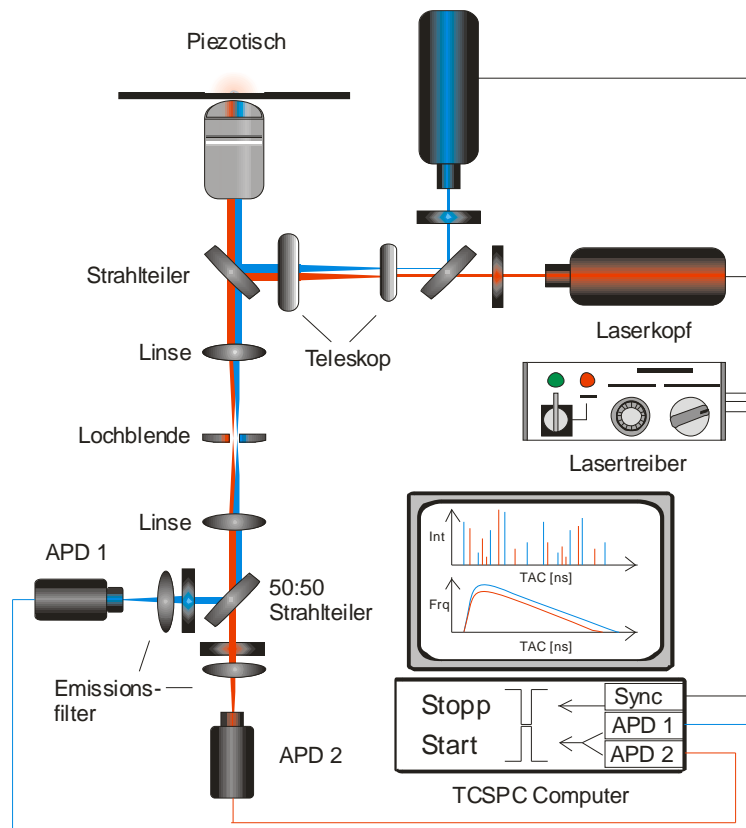


Abbildung 3.6.1: Schematischer Aufbau der in dieser Arbeit verwendeten SFLIM-Einzelmolekülanlage (*Spectrally-Resolved Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*).

Zunächst soll ein kurzer Überblick über die einzelnen Komponenten dieses Aufbaus gegeben werden, bevor diese im Anschluss detaillierter besprochen werden.

Der Laser (siehe Tabelle 3.6.1) wird zunächst durch ein Teleskop aufgeweitet und anschließend in den Seiteneingang eines inversen Mikroskops (Axiovert 100TV, Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) gelenkt. Im Mikroskop wird der Strahl über einen dichroitischen Strahlteiler abgelenkt und mit Hilfe eines Wasser-Immersion Objektivs (60x, 1,2 NA, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg) auf die Probe fokussiert. Die Proben können über einen, in drei Dimensionen verfahrbaren Piezo-Tisch (P561.3CL, Physik Instrumente, Deutschland) über den Laserfokus bewegt werden. Das Fluoreszenzlicht wird über dasselbe Objektiv gesammelt und durch eine Lochblende geleitet, die störendes Hintergrundsignal ausblendet. Die Sammellinse im einfachen Brennweitenabstand kollimiert das Emissionslicht, das über einen 50:50 Strahlteiler (LINOS Photonics GmbH & Co. KG, Göttingen, Deutschland) zu gleichen Teilen auf zwei Lawinen-Photodioden (APD, Avalanche Photo Diode, Perkin-Elmer, USA) gelenkt wird. Die beiden Sammellinsen ($f = 20 \text{ mm}$) unmittelbar vor den Detektoren fokussieren die

beiden Strahlen auf einen kleinen Bereich der aktiven Fläche des Detektors. Die detektierten Signale können mithilfe einer TCSPC-Karte (SPC-134, Becker&Hickl, Berlin, Deutschland) im FIFO Modus (*First-In, First-Out*) gesammelt und verarbeitet werden, d. h. für jedes Photon wird sowohl die makro- und mikroskopische Ankunftszeit, als auch der entsprechende Detektionskanal registriert. Für die Berechnung der Fluoreszenzlebensdauern ist die Detektorkarte zusätzlich mit dem Pulsgenerator (PDL-808 „Sepia“, PicoQuant GmbH, Berlin, Deutschland) synchronisiert.

Des Weiteren ist das Mikroskop mit einer Quecksilberdampf-Lampe (HBO 50 Short Arc Lamp, Osram, München, Deutschland) erweitert, um Durchlicht- und Fluoreszenzbilder von farbstoffmarkierten Zellen aufzuzeichnen. Die Aufnahme erfolgt über eine sogenannte *back-illuminated* EMCCD-Kamera (iXonEM, Andor, Belfast, Nordirland), die mit der Auswertungssoftware AndorSolis gekoppelt ist.

Anregungslichtquelle

Die Einzelmolekülmessungen wurden mit Laserlichtquellen durchgeführt, die kollimiertes monochromatisches Licht liefern. Je nach Experiment bzw. gewähltem Farbstoff wurden verschiedene Laser, gepulste und kontinuierliche (continuous wave) verwendet. Einen Überblick über die verwendeten Laser gibt Tabelle 3.6.1. Die Pulsbreite bei den Diodenlasern betrug weniger als 100 ps FWHM und die Intensität konnte stufenlos, die Repetitionsrate hingegen nur in diskreten Schritten über den Pulsgenerator PDL-808 „Sepia“ (PicoQuant GmbH, Berlin, Deutschland) gesteuert werden.

Aufgrund der Temperatur- und Intensitätsabhängigkeit der Wellenlänge des Lasers, wurden zusätzlich Anregungsfilter in den Strahlengang implementiert. Die vollständige Liste der verwendeten Filter ist in Tabelle 3.6.2 gegeben

Lichtquelle	Typ	Wellenlänge [nm]	Energie [mW]	Repetitionsrate [MHz]
LDH-P-C-470 (PicoQuant)	fasergekoppelter Diodenlaser	470	1 @ 40MHz	20-40
Cobolt Jive (Cobol AB, Solna, Schweden)	Festkörper Laser	561	50	cw
LDH-P-635 (PicoQuant)	fasergekoppelter Diodenlaser	635	2,5 @ 40 MHz	20-40
SKE001L (Koheras, Birkerød Dänemark)	Weißlicht Laser	470-700	~1 (pro Linie) insges 100 W	80

Tabelle 3.6.1: Übersicht über die verwendeten Anregungslichtquellen.

Probentisch

Als Probentisch wurde ein dreidimensional verfahrbarer, geschlossener Piezo-Scanner P561.3CL (Physik Instrumente (PI) GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) zusammen mit einem Dreikanal-Verstärker E-503.00 (Physikinstrumente) und einer kapazitiven Sensor-Kontrolleinheit E509.C3A (Physikinstrumente) verwendet. Der damit scannbare Bereich betrug $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$, gesteuert über einen linearen Spannungsanstieg von $1\ \text{V} / \mu\text{m}$. Der Probentisch wurde mittels einer PCI-6713-Karte zusammen mit einer, innerhalb der Arbeitsgruppe angefertigten Software basierend auf LabView 7.0 (National Instruments, USA) gesteuert. Weiterhin übernimmt die Software die Synchronisation der Tischbewegung mit den Daten der Detektoren.

Detektor

Die Einzelphotonendetektion erfolgte über zwei Lawinen-Photodioden (APD, Avalanche Photo Diode) von PerkinElmer (SPCM-AQR-14, Massachusetts, USA). Diese Halbleiterdetektoren konvertieren Photonen in Elektronen, die wiederum eine Reihe weiterer

Elektronen anregen können und so zu einem Lawineneffekt führen, dessen Signal proportional zur Lichtintensität ist. Die aktive Fläche beträgt etwa 180 μm Durchmesser. Die Detektoren sind im Bereich zwischen 500 und 850 nm hochempfindlich (Abbildung 3.6.2) und besitzen mit einer Detektionswahrscheinlichkeit von bis zu 65 % eine viel höhere Empfindlichkeit als beispielsweise PMT's [Louis, 1988]. Die Dunkelzählrate beträgt weniger als 100 Hz und die Totzeit zwischen zwei aufeinanderfolgenden Photonendetektionsereignissen liegt im Bereich um etwa 300 ns.

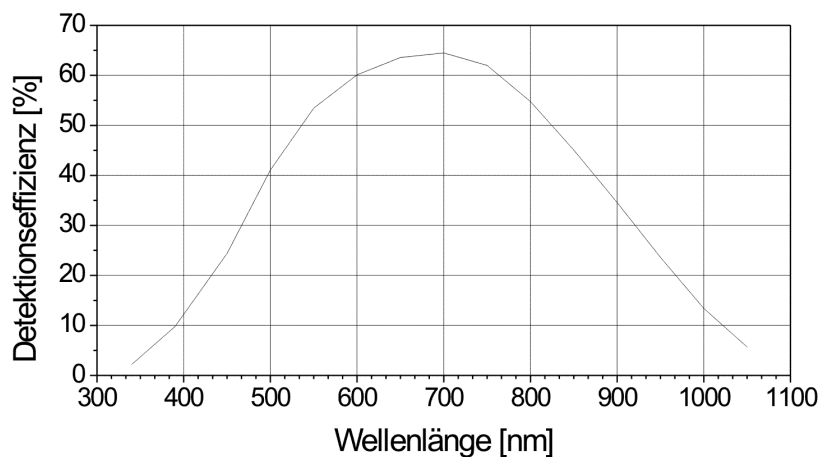


Abbildung 3.6.2: Wellenlängenabhängige Detektionseffizienz einer APD der AQR-14 Serie. Die höchste Detektionswahrscheinlichkeit wird knapp unter 700 nm erreicht, sprich in der Region in der die in dieser Arbeit verwendeten Farbstoffe emittieren.

TCSPC Karte

Für die Datenerfassung wurde eine zeitkorrelierte Karte zum Zählen einzelner Photonen (TCSPC-Karte, SPC-134, Becker & Hickl GmbH, Berlin, Deutschland) verwendet. Die detektierten Photonen werden, wie bereits am Anfang des Kapitels beschrieben, bei gepulster Anregung mit drei verschiedenen Informationen abgespeichert. Hierfür ist der Pulsgenerator mit der Messkarte synchronisiert (SYNC-Signal). Da nicht in jedem Pulszyklus Photonen detektiert werden, wird die Karte im inversen Modus betrieben, d. h. nicht der Anregungspuls gibt das Startsignal, sondern das ankommende Photon. Die APD sendet das Signal an die Messkarte und dort wird es mit der Makrozeit, d. h. der Zeit nach dem Beginn der Messung versehen. Zusätzlich wird durch die Detektion des Photons ein Spannungssignal gestartet, welches durch den darauffolgenden Puls gestoppt wird. Die Spannung kann mithilfe eines Analog-Digital-Wandlers (ADC, *Analog-to-Digital Converter*) in die Mikrozeit umgewandelt werden, die mit dem Zeitfenster des

Zeit-Amplituden-Wandlers (TAC, *Time-to-Amplitude Converter*) verbunden ist. Die Größe des TAC-Fensters entspricht der Zeit zwischen zwei Anregungslichtpulsen.

Die digitalisierten Daten werden im TAC-Zeitfenster in bis zu 4096 Kanäle sortiert, die den jeweiligen Ankunftszeiten nach dem Laserpuls entsprechen. Werden diese Mikrozeiten über einen bestimmten Zeitraum histogrammiert, lässt sich aus der Faltung des Laserpulses mit der Fluoreszenzabklingkurve wiederum die Fluoreszenzlebensdauer berechnen (siehe Kapitel 2.1.5). Nach jedem detektierten Photon, und damit der nachfolgenden Verarbeitung des Signals durch die TCSPC-Karte, wird einige Zeit benötigt um alle Informationen zu speichern. In dieser sogenannten Totzeit der Karte kann kein weiteres Signal bzw. Photon detektiert werden.

Filter und Strahlteiler

Die Anregung durch Laser verschiedener Wellenlängen erfordert eine genaue Auswahl der Filter und Strahlteiler. Diese sind in Tabelle 3.6.2 zusammengestellt.

Als Anregungsfilter werden in der Regel sehr schmalbandige Filter verwendet, die nur diejenigen Wellenlängen des Laserspektrums durchlassen, die für die effektive Anregung des Farbstoffes erforderlich ist. Der Anregungsstrahlteiler wird in der Regel so gewählt, dass das kurzwelligere Laserlicht in das Objektiv reflektiert, das zu größeren Wellenlängen verschobene Fluoreszenzlicht jedoch durchgelassen wird. Ein geeigneter Emissionsfilter sollte das gestreute Anregungslicht effektiv blocken und das Fluoreszenzlicht passieren lassen.

Anregung	Anregungsfilter	Strahlteiler	Emissionsfilter
470 nm	470 DF 10	z 470/633	515 DF 70
635 nm	639 DF 9	z 470/633	670 DF 55
561 nm	560 DF 40	585 DRLP	630 DF 75
HG-Lampe	480 DF 30	505 DRLP	535 DF 40
	625 DF 34	646 DRLP	675 DF 50

Tabelle 3.6.2: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Filter und Strahlteiler. Diese wurden von der Firma AHF Analysentechnik AG (Tübingen, Deutschland) bezogen. Im Emissionsstrahlengang wurde in allen Experimenten ein 50:50-Strahlteiler (LINOS Photonics GmbH & Co. KG, Göttingen, Deutschland) verwendet.

3.6.2. Leica TCS SP5 X

Die Messungen zur Überprüfung der Markierungseffizienz der BG- und CP-Substrate mithilfe verschiedener Transfektionsreagenzien wurden am kommerziell erhältlichen TCS SP5 X der Firma Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, Deutschland) durchgeführt. Dieses ebenfalls konfokale Mikroskop ist mit einem Weißlichtlaser (SuperK™ Extreme, Koheras, Birkerød, Dänemark) als Anregungslichtquelle ausgestattet, dessen Wellenlänge von 470 – 700 nm kontinuierlich einstellbar ist. Dadurch ist es möglich, die gewählten Farbstoffe jeweils an ihrem Absorptionsmaximum anzuregen. Zusätzlich können bis zu acht verschiedene Anregungslinien parallel verwendet werden, was z. B. Kollokalisationsexperimente stark vereinfacht.

Die Bildaufnahme erfolgte in diesem Fall über Laserscanning, d. h. der Laserstrahl wurde mit elektronisch steuerbaren Spiegeln über die Probe gelenkt. Der ebenfalls elektronisch kontrollierte und frei einstellbare Akusto-Optische Strahlteiler (AOBS®, Acousto-Optical Beam Splitter) ersetzt in diesem System den konventionellen Anregungsstrahlteiler und erlaubt so die freie Wahl verschiedener Anregungslinien des Weißlichtlasers.

Die Detektion erfolgte über gekühlte Photovervielfacher (PMT's), die allerdings weniger empfindlich als APD's sind. Kontinuierlich einstellbare Schlitzphotometer vor den Detektoren erlauben jegliche Einstellung der Wellenlänge und bieten damit die Möglichkeit die Emissionsfilter sehr genau einzustellen.

3.7. SOFTWARE

In dieser Arbeit wurde neben einiger kommerziell erhältlicher Software (Microcal® Origin 6.0, CorelDRAW 12, LabVIEW™ 7.1 (National Instruments), ImageJ 1.40g) zur Datenanalyse, größtenteils selbstentwickelte Programme zur Datenerfassung und -auswertung verwendet. Diese wurden in der Arbeitsgruppe durch Dr. D.-P. Herten und Dr. C. Roth in LabVIEW programmiert und werden im folgenden Abschnitt näher erläutert.

3.7.1. DAQLinescan (Datenerfassung)

Für die Datenerfassung, sprich die Aufnahme von Fluoreszenzintensitätsbildern und -spuren, wurde das Programm DAQLinescan bzw. das in dieses Programm implementierte Unterprogramm DAQFIFO verwendet.

Die Aufnahme von Bildern erfolgt so, dass das zu messende Objekt rechts unten vom Laserfokus platziert wird. Der Piezo-Tisch scannt eine, durch die Software entsprechend vorgegebene Strecke in x-Richtung, und springt am Ende der Zeile zum Startpunkt dieser Zeile zurück. Anschließend bewegt sich der Tisch einen Schritt in y-Richtung und die Messung in x-Richtung erfolgt von Neuem. Der Tisch bewegt sich allerdings nicht kontinuierlich über die Probe. Vielmehr wird diese in definierten Rastern abgetastet, die durch die voreingestellte Auflösung (*Image Resolution*, zumeist 50, 100 oder 200 nm) und eine bestimmte Integrationszeit (*Integration Time*, meist 2 – 200 ms) gegeben ist. Die gesammelten Photonen innerhalb eines Pixels werden aufsummiert und entweder in ein RGB- oder in ein Falschfarbenbild übersetzt.

Zur Aufnahme von Intensitätsspuren für z. B. die FCS-Analyse wurde die entsprechend zu messende Stelle über dem Laserfokus platziert. Dort wurde mit einer voreingestellten Integrationszeit die Fluoreszenzintensität mit der Zeit aufgenommen. Aus diesen Spuren kann durch entsprechende Auswertesoftware die Fluoreszenzlebensdauer wie auch die spektrale und Korrelationsinformation in jedem Bereich der Zeitspur (MCS-Trace) gewonnen werden.

3.7.2. AnaLinescan

Mithilfe von AnaLinescan ist es möglich, die aufgenommenen Intensitätsbilder zu analysieren. So kann dieses Programm sowohl Fluoreszenzlebensdauerbilder wie auch F_2 -Bilder (vom Detektionskanal abhängige, spektral getrennte Bilder) erstellen. Hierfür wird für jeden Bildpunkt die entsprechende Lebensdauer bzw. der F_2 -Wert berechnet. Die Lebensdauerberechnung erfolgt über die Maximum Likelihood Estimation (siehe Kapitel 2.1.5). Der F_2 - Wert berechnet sich aus dem Quotienten der Intensität des zweiten, bei spektraler Trennung der APD's kurzwelligen Kanals und der Summe der Intensitäten beider Kanäle:

$$F_2 = \frac{I_2}{I_1 + I_2}$$

Des Weiteren ist das Programm mit einem Punktidentifikations-Algorithmus ausgestattet, der für jeden Punkt die mittlere Lebensdauer, den F_2 -Wert und die Anzahl der Moleküle über Koinzidenzanalyse zu berechnet [Weston, 2002].

Eine Erweiterung des Programms ermöglicht die Auswertung von Diffusionsbildern. Dies wird im nächsten Abschnitt „Bildgebende Diffusions-Mikroskopie“ genauer beschrieben, da es die in dieser Arbeit hauptsächlich verwendete Software ist.

3.7.3. Bildgebende Diffusionsmikroskopie (DIFIM)

Die bildgebende Diffusionsanalyse wurde von Dr. D.-P. Herten und Dr. C. Roth entwickelt und in die bis dahin bereits existierende Auswertesoftware AnaLinescan implementiert [Roth, 2006; Roth, 2007]. Die Methode kombiniert die konfokale Einzelmolekülspektroskopie (SFLIM) mit der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS). Mit ihr ist es möglich, Heterogenitäten der Diffusion in Zellen, oder allgemein in den Proben orts aufgelöst wiederzugeben.

Für die Auswertung können die mit einer entsprechend hohen Integrationszeit aufgenommenen SFLIM-Bilder verarbeitet werden. Hierbei wird für jeden Bildpunkt die entsprechende Fluoreszenzkorrelationskurve, entweder als Auto- oder als Kreuzkorrelation, berechnet. In dieser Arbeit wurde die Methode des „*photon by photon*“ gewählt, bei der die Photonen, die innerhalb eines Anregungszyklus detektiert werden, zusammengefasst („*binning*“) werden und anschließend für die Korrelation zu Rate gezogen werden. So wird für jeden einzelnen Bildpunkt eine Korrelationskurve erhalten. Für die Korrelationsbilder wurden jeweils vier benachbarte Bildpunkte zusammengefasst und der Mittelwert dieser Korrelationen in einem neuen Bildpunkt dargestellt. Hierfür wurde eine 2x2-Maske Punkt für Punkt und anschließend Zeile für Zeile über das gesamte Bild verschoben (siehe Abbildung 3.7.1).

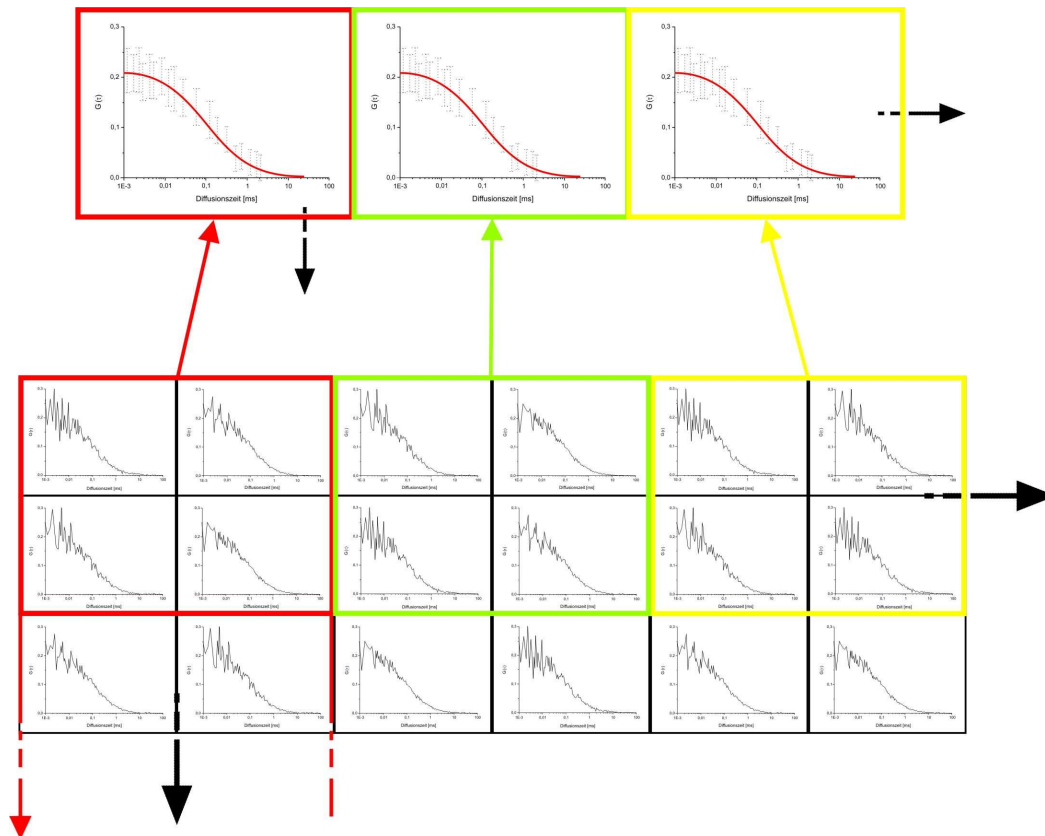


Abbildung 3.7.1: Schematische Darstellung der Bildanalyse. Die Korrelationen von jeweils vier benachbarten Bildpunkten werden zu einer neuen zusammengefasst (rot). Anschließend wird das „Raster“ um zwei Bildpunkte verfahren (grün) und die nächsten 4 Korrelationen werden zu einer weiteren Korrelation zusammengefasst (gelb).

3.7.4. ALV-Karte

Die FCS-Messungen wurden mit einer ALV5000/E-Karte von ALV-Laser Vertriebs GmbH (Langen, Deutschland) aufgenommen und der mitgelieferten Software korreliert (Version 1.4.9). Mit dieser Karte ist es möglich, gleichzeitig zwei Kanäle aufzunehmen und über Autokorrelation oder Kreuzkorrelation zu analysieren. Es können Zählraten bis zu 125 MHz detektiert werden. Typischerweise wurden drei direkt aufeinanderfolgende Messungen von jeweils 30 Sekunden aufgenommen und anschließend gemittelt. Die Daten wurden als ASCII-Daten gespeichert und über Origin 6.0 (Microcal Software, Northampton, USA) ausgewertet.

4. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

Die bildgebende Mikroskopie ist eine sehr leistungsstarke Methode, um Informationen über die Funktion und Regulation von Proteinen zu erhalten. Erfreulicherweise gibt es optische Mikroskopietechniken, die sowohl für quantitative Studien an lebenden Zellen, als auch zur Untersuchung von Proteindynamiken herangezogen werden können. Hierzu gehören z. B. die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS), die Bildgebende-Korrelations-Spektroskopie (ICS), Fluoreszenzerholung nach Photobleichen (FRAP) oder Einzelpartikel-Verfolgung (SPT). Jede dieser Techniken liefert *in situ*-Informationen in Bezug auf die Mobilität, Diffusionseigenschaften, Konzentration und Aggregationstendenz von Proteinen.

In dieser Arbeit sind experimentelle Voraussetzungen und Lösungen zur Verwendung einer neuartigen Methode zur Erforschung der Mobilität und Diffusion von Proteinen in lebenden Zellen beschrieben: Bildgebende Diffusionsmikroskopie (*Diffusion Imaging Microscopy* - DIFIM). Für diese ist es erforderlich, sowohl membrangängige, als auch photostabile Farbstoffe zu verwenden, die die Zelle bzw. das zu untersuchende Protein möglichst wenig beeinflussen. Deshalb gliedert sich diese Arbeit in zwei Hauptteile. Der erste Teil beschäftigt sich mit der Erprobung von DIFIM an einem Testsystem für lebende Zellen. Der zweite Teil befasst sich mit der spezifischen Fluoreszenzmarkierung der Proteine *in vivo*.

4.1. BILDGEBENDE DIFFUSIONSMIKROSKOPIE (DIFIM)

Mithilfe von FCS ist es möglich, lokale Aussagen über Diffusionseigenschaften zu erhalten. FCS liefert jedoch keine räumlich aufgelösten Informationen, da nur Punktmessungen, d. h. Messungen im fokalen Volumen stattfinden [Madge 1974; Berland 1995]. Im Gegensatz dazu ist ICS eine bildgebende Methode, die Informationen über mehrere Bilder mittelt. Allerdings ist letztere Methode auf relativ langsame Diffusionsprozesse von mehreren Millisekunden ($>10 - 100$ ms) beschränkt, da die Abtastrate kürzer als der jeweilige Diffusionsprozess sein muss [Ruan 2004; Wiseman 1999]. Des Weiteren ist es nicht möglich, Informationen mit hoher räumlicher Auflösung zu erhalten.

Die in unserer Arbeitsgruppe durch Dr. C. Roth und Dr. D. P. Herten entwickelte Bildgebende Diffusionsmikroskopie (DIFIM – *Diffusion Imaging Microscopy*) ermöglicht es, sowohl Intensitäts- und Lebensdauerbilder, als auch Informationen über

Diffusionszeiten und Konzentrationen aufzunehmen. Weiterhin ist es möglich, die hohe Auflösung von konfokalen Mikroskopen aufrecht zu erhalten. DIFIM konnte bereits erfolgreich eingesetzt werden, um unterschiedliche Diffusionszeiten in Lösung zu detektieren [Roth 2006]. Durch Aufnahme der gesamten Information innerhalb einer Messung ist eine genaue räumliche Zuordnung von z. B. der Diffusionszeit im gemessenen Bildausschnitt möglich. Im Folgenden sollen Experimente zur prinzipiellen Anwendbarkeit der Methode auf Untersuchungen in lebenden Zellen beschrieben werden.

Hierzu wurde ein Testsystem bestehend aus einem farbstoffmarkierten Oligonukleotid und lebenden Mäusefibroblasten (NIH 3T3) gewählt. Das Oligonukleotid (dT_{20}) wurde so ausgesucht, dass es an den PolyA-Strang der zelleigenen *messenger*-RNA (mRNA) hybridisieren kann. Dieser PolyA-Strang befindet sich am 3'-Ende der mRNA und besteht aus 30 – 200 Adenosin-Molekülen. Er bewahrt die mRNA vor enzymatischem Abbau und erleichtert den Transport aus dem Zellkern heraus. Ein 20-mer sollte aufgrund seiner relativ geringen Größe in der Lage sein, mittels Diffusion durch die Zellmembran in die Zelle zu gelangen. Zusätzlich wurde innerhalb des Oligonukleotids anstelle eines nichtverbrückenden Sauerstoffatoms im Phosphatrest ein Schwefelatom substituiert (s. Kapitel 7.3). Damit ist das Nukleotid stabiler gegen Verdauungsenzyme im Zytoplasma der Zelle und sollte nicht zu schnell von der Zelle verdaut werden.

Unterschiedliche Zellkompartimente besitzen unterschiedliche Viskositäten. Diese können nicht nur dazu genutzt werden, um die Kompartimente sichtbar zu machen (hierfür gibt es bereits ausreichend empfindliche Methoden), sondern auch um das Verhalten von Diffusions- und Transportprozessen in Echtzeit aufzuklären.

Zur Erprobung wurde das Oligonukleotid (dT_{20}) mit dem Fluoreszenzfarbstoff Atto 488 markiert. Anschließend wurde die markierte Sonde durch zweistündige Inkubation bei 37 °C in Zellen geschleust.

Die Zellen wurden sowohl vor, als auch nach der Messung mit einer EMCCD-Kamera aufgenommen (Abbildung 4.1.1), um den Zellzyklus zu beobachten und sicherzustellen, dass die Zelle während der Messung adhärent bzw. in ihrer Position geblieben ist. Dies ist notwendig, um sicherzustellen, dass sich die Zelle während der Messung nicht bewegt. Die Fluoreszenz wurde weiterhin mit einer Quecksilberlampe angeregt, um die Markierung der jeweiligen Zelle und die Verteilung des Farbstoffes zu überprüfen.

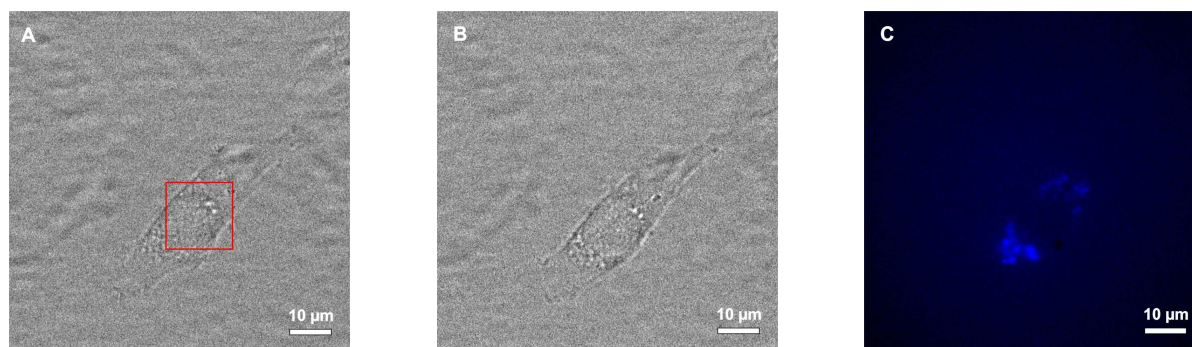


Abbildung 4.1.1: Transmissionbild einer mit dT_{20} -Atto 488 inkubierten Zelle (A) vor der Messung, (B) nach der Messung, (C) Fluoreszenzbild vor der Messung. Das rot markierte Kästchen kennzeichnet den Ausschnitt, der für die Einzelmolekülmessungen (Abbildung 4.1.2) herangezogen wurde.

In Abbildung 4.1.2-A ist der Zellkern (N) als Region niedriger Fluoreszenzintensität zu erkennen. Im Zytoplasma (Z) ist die Intensität etwas höher bzw. gibt es Regionen, in denen die Fluoreszenz sehr hoch ist.

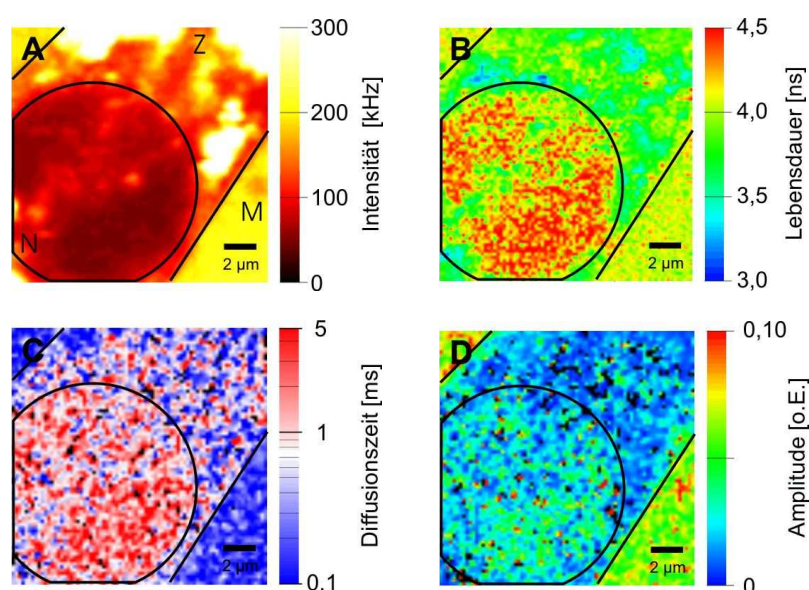


Abbildung 4.1.2: Mit dT_{20} -Atto 488 ($c = 1 \cdot 10^{-6}$ M) inkubierter 3T3-Fibroblast, $16 \times 16 \mu\text{m}^2$, $100 \text{ nm} / \text{Pixel}$ Auflösung, $100 \text{ ms} / \text{Pixel}$ Integrationszeit (A) Fluoreszenzintensitätsbild, (B) Fluoreszenzlebensdauerbild, (C) Diffusionszeitbild nach Autokorrelation der beiden Detektionskanäle, (D) Amplitudenbild. Z: Zytoplasma; N: Nukleus, M: Medium.

Abbildung 4.1.3-A zeigt eine weitere, mit dT_{20} -Atto488 inkubierte Zelle. Hier ist die Fluoreszenz im Zellkern (N) höher als die im umgebenden Zytoplasma (Z). Die Fluoreszenzintensität im umgebenden Medium (M) ist gering.

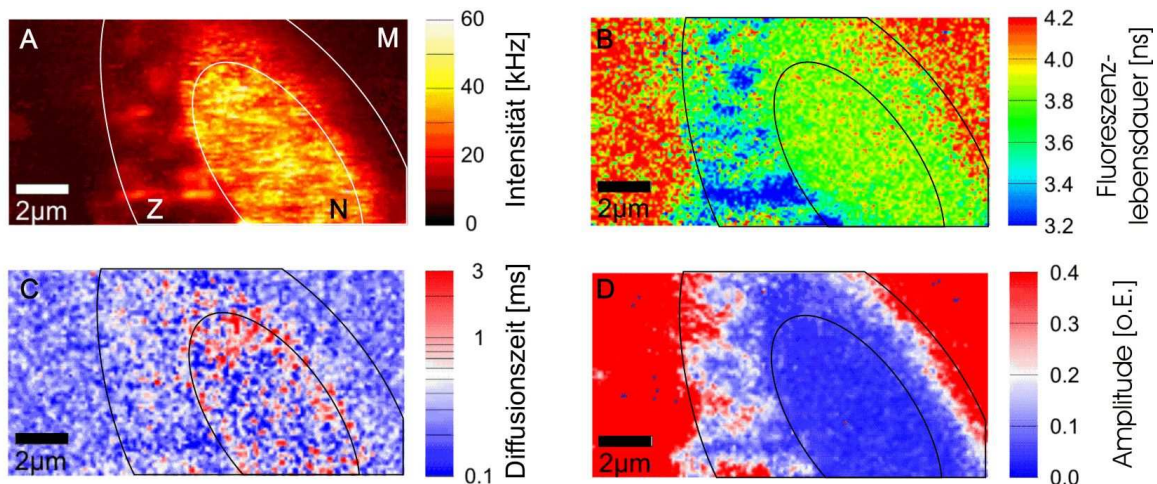


Abbildung 4.1.3: Mit dT_{20} -Atto 488 ($c = 1 \cdot 10^{-6}$ M) inkubierter 3T3-Fibroblast, $5 \times 10 \mu\text{m}^2$, 100 nm / Pixel Auflösung, 100 ms / Pixel Integrationszeit (A) Fluoreszenzintensitätsbild, (B) Fluoreszenzlebensdauerbild, (C) Diffusionszeitbild nach Autokorrelation der beiden Detektionskanäle, (D) Amplitudenbild. Z: Zytosol; N: Nukleus, M: Medium.

Diese beiden Beispiele zeigen, dass sich die Zellen nicht immer gleich verhalten. Beide Fluoreszenzverteilungen wurden etwa gleich häufig erhalten. Eine Möglichkeit, weshalb die Zellen sich unterschiedlich verhalten, könnte daran liegen, dass sich die Zellen jeweils in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus befinden.

Die geringere Fluoreszenzintensität im Zellkern (Abbildung 4.1.2) könnte dadurch erklärt werden, dass die Sonde auf ihrem Weg ins Zellinnere, aufgrund der Markierungsmethode, bis zum Zellkern (N) zwei, bis ins umgebende Zytoplasma (Z) jedoch nur eine Zellmembran überwinden muss. Die Intensität im umgebenden Medium (M) wurde vor der Messung durch mehrfaches Waschen reduziert, jedoch liegt es nahe, dass die Zelle den Marker (einen Fremdkörper) zum Teil über Exocytose [Alberts 2002] aus der Zelle herausschleust, wodurch das umgebende Medium erneut belastet wird.

Die erhöhte Fluoreszenzintensität im Zellkern (Abbildung 4.1.3) kann durch Hybridisierung des Oligonukleotids an den PolyA-Strang der mRNA erklärt werden. Diese befindet sich zu 90 % im Zellkern, etwa 10 % gelangen ins Zytoplasma. Damit ergibt sich die Möglichkeit, dass sich die fluoreszenzmarkierte Sonde im Zellkern anhäuft.

Unmarkierte Zellen zeigen unter normalen Bedingungen üblicherweise eine Autofluoreszenzlebensdauer zwischen 2–2,5 ns [Schlüter 2004]. In Abbildung 4.1.2-B wie auch in Abbildung 4.1.3-B liegt die durchschnittliche Lebensdauer in den meisten Bereichen jedoch über 3,5 ns und weist damit eine ähnliche Fluoreszenzlebensdauer wie Atto 488 auf, der in wässrigem Medium normalerweise eine Lebensdauer von 3,2 ns besitzt.

Im zugehörigen Diffusionsbild 4.1.2-C ist im Bereich des Nukleus eine deutlich langsamere Diffusion als in den umgebenden Kompartimenten und im Medium zu erkennen. Dies ist zu erwarten, da das umgebende Medium eine geringere Viskosität als die Zelle aufweist. Zusätzlich sind Heterogenitäten der Diffusionszeiten innerhalb des Kerns erkennbar, die keinem der Kontraste entsprechen, die im Intensitäts- oder Lebensdauerbild zu sehen sind. Das heißt, es gibt sowohl Pixel mit geringer Intensität und einer langen Diffusionszeit, als auch geringe Intensitäten mit einer kurzen Diffusionszeit. Demnach korrelieren die Bilder untereinander nicht, und es ist mithilfe von DIFIM gelungen, eine zusätzliche Bildgebung – die bildgebende Diffusion – zu erhalten. Im Zytoplasma ist der Unterschied zwischen den kurzen und langen Diffusionszeiten ausgeprägter als im Zellkern. Das kann einerseits daran liegen, dass zusätzlich zu dem an die mRNA gebundenen Substrat, nicht gebundene Oligonukleotide im Zytoplasma verblieben sind, die eine kürzere Diffusionszeit aufweisen sollten. Andererseits könnte die Häufung verschiedener Kompartimente im Zytoplasma und damit verbunden unterschiedliche Viskositäten einen weiteren Grund für diese Heterogenitäten darstellen. Allerdings sind die Zellkompartimente nicht klar gegeneinander abgrenzbar.

Mit DIFIM ist es schwierig, absolute Diffusionszeiten zu messen. Dies ist vor allem darin begründet, dass die Bilder, im Vergleich zu Standard-FCS Messungen, mit kurzen Integrationszeiten von 25 – 200 ms pro Pixel aufgenommen werden. Durch die kurzen Zeiten werden aufgrund der kleineren Statistik verrauschtere Daten erhalten, welche wiederum mit einem größeren Fehler behaftet sind. Folglich sind die mit DIFIM erhaltenen Diffusionszeiten als relative Werte anzusehen, die es ermöglichen Heterogenitäten aufzuzeigen, und so Informationen über Transportwege und –prozesse zu erhalten. Die kurzen Integrationszeiten sind notwendig, um die Messdauer in einem adäquaten Rahmen zu halten. Bei einem größeren Bild von z. B. $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ und einer Auflösung von 50 nm/Pixel (entspricht insgesamt 200×200 Pixel) beträgt die Messdauer für eine Integrationszeit von 25 ms/Pixel etwa 17 min. Für eine Integrationszeit von 100 ms/Pixel beträgt die Messzeit bereits 67 min. Diese Messdauer ist aufgrund der Zellbewegung und Photostabilität der Farbstoffe nicht sinnvoll. Deshalb ist es für DIFIM-Messungen notwendig, jeweils die Integrationszeit und Auflösung genau gegeneinander abzuwägen, damit eine akzeptable Messdauer resultiert, trotzdem aber möglichst wenig Information verloren geht.

Für die Auswertung der Daten wird, um die Rechenzeit möglichst gering zu halten, ein zweidimensionales Fit-Modell angewendet, obwohl der Messung eine dreidimensionale Diffusion zugrunde liegt. Durch Vergleich der Kurven für die jeweiligen Modelle

(Abbildung 4.1.4) wird deutlich, dass sich diese nur sehr geringfügig unterscheiden. Der Fehler der durch DIFIM gewonnenen Daten ist größer, als die Abweichung der Diffusionszeit bei Verwendung einer 2D- im Vergleich zu einer 3D-Modellanpassung. Somit geht durch die Anpassung des relativ einfachen Modells der zweidimensionalen Diffusion an die Daten keine Information verloren.

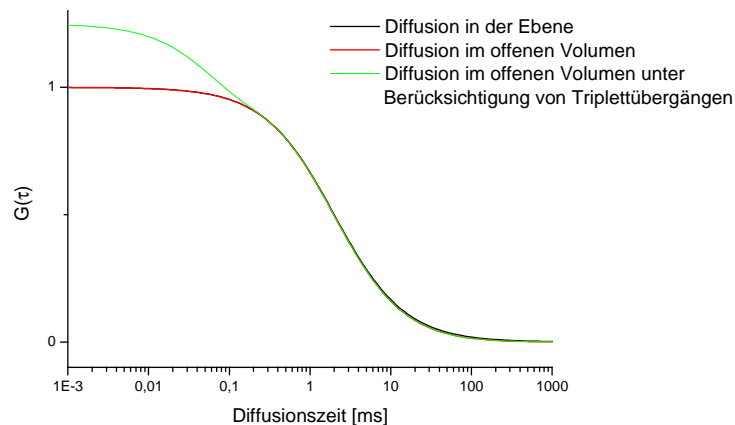


Abbildung 4.1.4: Mit Vergleich der Modellfunktionen der Diffusion in der Ebene (2D, schwarz), im offenen Volumen (3D, rot) und im offenen Volumen unter Berücksichtigung von Triplett-Übergängen (3D/Triplett, grün). Als Parameter wurde eine Diffusionszeit von 2 ms angenommen, der Formparameter k des fokalen Volumens betrug 0,125. Für die Triplettamplitude wurde ein Wert von 0,2, für die Triplettlebensdauer ein Wert von 50 μ s angenommen.

Bei Betrachtung des Amplitudenbildes 4.1.2-D wird erkennbar, dass die Amplitude im Bereich der Zelle gut mit der Intensität (Abbildung 4.1.2-A) korreliert. Dort wo die Intensität, d. h. die Konzentration an Fluorophoren hoch ist, wird eine geringere Amplitude (1), dort wo die Intensität geringer ist, eine höhere Amplitude (2) erhalten (Abbildung 4.1.5).

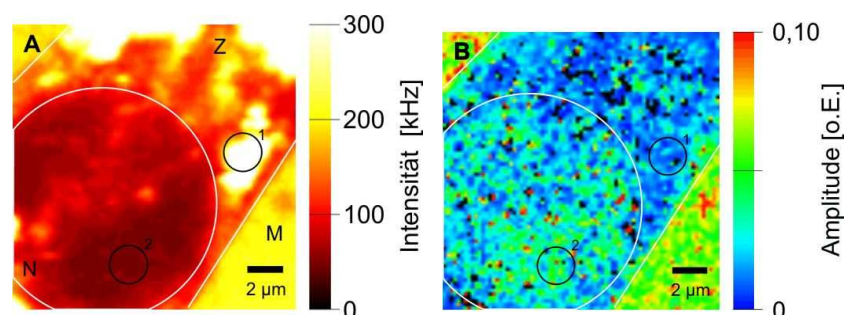


Abbildung 4.1.5: Mit dT_{20} -Atto 488 inkubierter 3T3-Fibroblast, (A) Fluoreszenz-intensitätsbild, (B) Amplitudenbild. Zur Verdeutlichung des Zusammenhangs zwischen Intensität und Amplitude wurden kleine Bereiche durch Kreise markiert. N: Nukleus, Z: Zytoplasma, M: Medium.

Dies entspricht der Annahme, dass die Amplitude umgekehrt proportional zur Konzentration ist (Kapitel 2.3.1). Unklar bleibt, weshalb außerhalb der Zelle eine relativ

hohe Fluoreszenz auftritt und die Amplitude ebenfalls einen hohen Wert aufweist. In Abbildung 4.1.3-D wird dies noch deutlicher. So wird innerhalb der Zelle, wo eine höhere Intensität detektiert wurde, eine Amplitude zwischen 0 und 0,15 erhalten. Im Zytoplasma, in dem eine geringere Fluoreszenzintensität gemessen wurde, liegt die Amplitude bei einem höheren Wert von 0,35 – 0,4. Allerdings sollte hierbei beachtet werden, dass die Amplitude nur für einen engen Konzentrationsbereich zuverlässig ist. Das bedeutet, dass die Aussagekraft der Amplitude für die hier erhaltenen großen Intensitätsschwankungen gering ist.

Mithilfe des vorgestellten Experimentes konnte gezeigt werden, dass DIFIM nicht nur in lebenden Zellen angewendet werden kann, sondern auch eine geeignete Methode ist, um unterschiedliche Diffusionszeiten *in vivo* darzustellen.

Im Folgenden wurde der JAK-STAT-Signalweg [Schindler 1995; Ihle 1996] genauer untersucht, der in der Regulierung der Zellantwort auf Zytokine und Wachstumsfaktoren eine Rolle spielt (JAK – Janus Kinase, STAT - Signal Transducers and Activators of Transcription) (Abbildung 4.1.6).

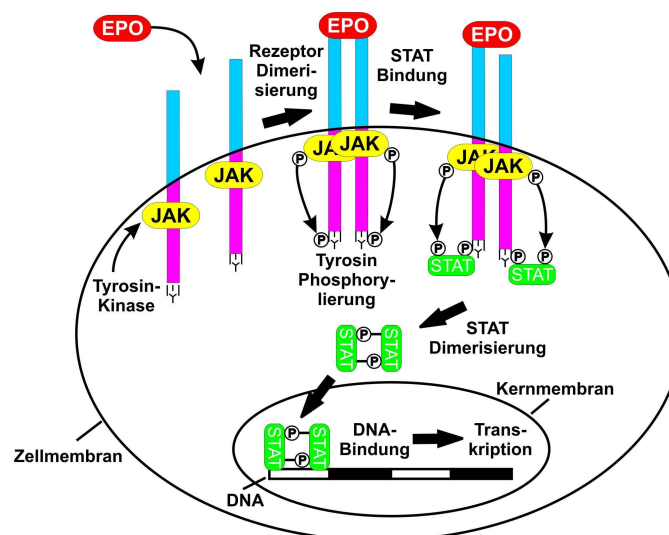


Abbildung 4.1.6: Schema des JAK-STAT Signalweges.

Die Janus-Kinasen, können an Zytokin-Rezeptoren binden, die sich auf der Zelloberfläche befinden. Durch Bindung eines Liganden an den Rezeptor wird die Aktivierung der JAK'S eingeleitet. Im Falle des in dieser Arbeit untersuchten STAT5b, ist dies der Erythropoietin-Rezeptor (EpoR) bzw. Erythropoietin. Mit erhöhter Kinase-Aktivität werden phosphorylierte Tyrosinreste am Rezeptor gebildet, und ermöglichen so

die Wechselwirkung mit Proteinen, die eine phosphorotyrosin-bindende SH₂-Gruppe besitzen. STAT's, die solche Thiol-Gruppen besitzen, können an diese phosphorylierten Tyrosinreste binden und werden so durch die Janus-Kinasen am Tyrosin phosphoryliert. Folglich besitzen diese aktivierten STAT's wiederum Bindungsstellen für SH-Gruppen und ermöglichen eine Dimerisierung. Nur das Dimer ist in der Lage, die Transkription des Zielgens im Zellkern zu aktivieren.

Für die Untersuchung von STAT5b mithilfe Bildgebender Diffusionsmikroskopie wurde das Protein mit GFP fusioniert und anschließend in 3T3-Fibroblasten transfiziert. Des Weiteren wurde den Zellen ein Transaktivator zugegeben, der es ermöglicht, durch Zugabe unterschiedlicher Mengen eines Transduktionsreagenz, wie z. B. Doxycyclin, die Menge von STAT5b und damit die Intensität des GFP's zu regulieren.

In Abbildung 4.1.7 ist das Intensitätsbild einer mit STAT5b-GFP transfizierten Zelle gezeigt. Diese wurden vor der Messung mittels Erythropoetin zur Expression des Fusionsproteins stimuliert. Das zugehörige Diffusionsbild ist nicht dargestellt, da es nicht möglich war, zuverlässige Diffusionszeiten zu erhalten.

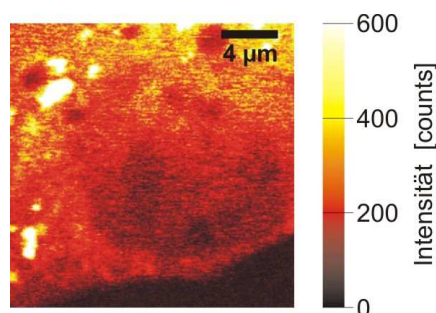


Abbildung 4.1.7: Mit STAT5b-GFP transfizierter Fibroblast. 20 x 20 µm², Integrationszeit 50 ms / Pixel, Auflösung 50 nm / Pixel.

Hier ist erkennbar, dass die Fluoreszenzintensität während der Messung – diese erfolgte Zeile für Zeile von oben nach unten – schwächer wird. Das bedeutet, dass das Fluoreszenzsignal des GFP's merklich abnimmt. GFP besitzt eine geringe Photostabilität im Vergleich zu anderen, synthetischen Farbstoffen und wird während der Messung zunehmend photozerstört. Dies führt dazu, dass der Anteil an nichtfluoreszenten Molekülen während der Messung zunimmt. Zusätzlich verschiebt sich die Kurve mit zunehmendem Photobleichen zu kürzeren Zeiten [Widengren 1996, Eggeling 1998]. Um Photozerstörung zu verringern oder ganz auszuschließen kann die Anregungsleistung herabgesetzt werden. Allerdings sind bei GFP bereits bei geringen Anregungsintensitäten um 10 µW erste Anzeichen von Photobleichen zu erkennen, die es unmöglich machen, aussagekräftige Diffusionsbilder zu erhalten. Bei einer höheren Anregungsleistung wird das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis besser und die

gewonnenen Korrelationen werden weniger verrauscht. Dies ist wichtig, da geringeres „Rauschen“ in der Auswertesoftware zu weniger Fehlern im Anpassen der Modellfunktion führt. Somit ist es von Vorteil bei höheren Anregungsintensitäten zu messen. Für die folgenden Experimente in lebenden Zellen wurden deshalb Anregungsleistungen zwischen 50 und 100 μW gewählt.

Zur Untersuchung des Bleichverhaltens von GFP wurde eine GFP-markierte Zelle über längere Zeit belichtet und in verschiedenen Zeitabständen Fluoreszenzbilder an einem Leica SP5 System aufgenommen. Dieses hat den Vorteil, dass das gegenüber dem *Objektscanning* schnellere *Laserscanning* angewendet werden kann. Da es beim Laserscanning nicht möglich ist, längere Zeit pro Pixel zu integrieren, ist diese Methode für DIFIM nicht geeignet. In Abbildung 4.1.8 sind die Fluoreszenzbilder in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Die Zelle wurde über den gesamten Messzeitraum von 12 min durchgehend mit dem Laser belichtet. Dies entspricht einer Integrationszeit von 15 ms/Pixel.

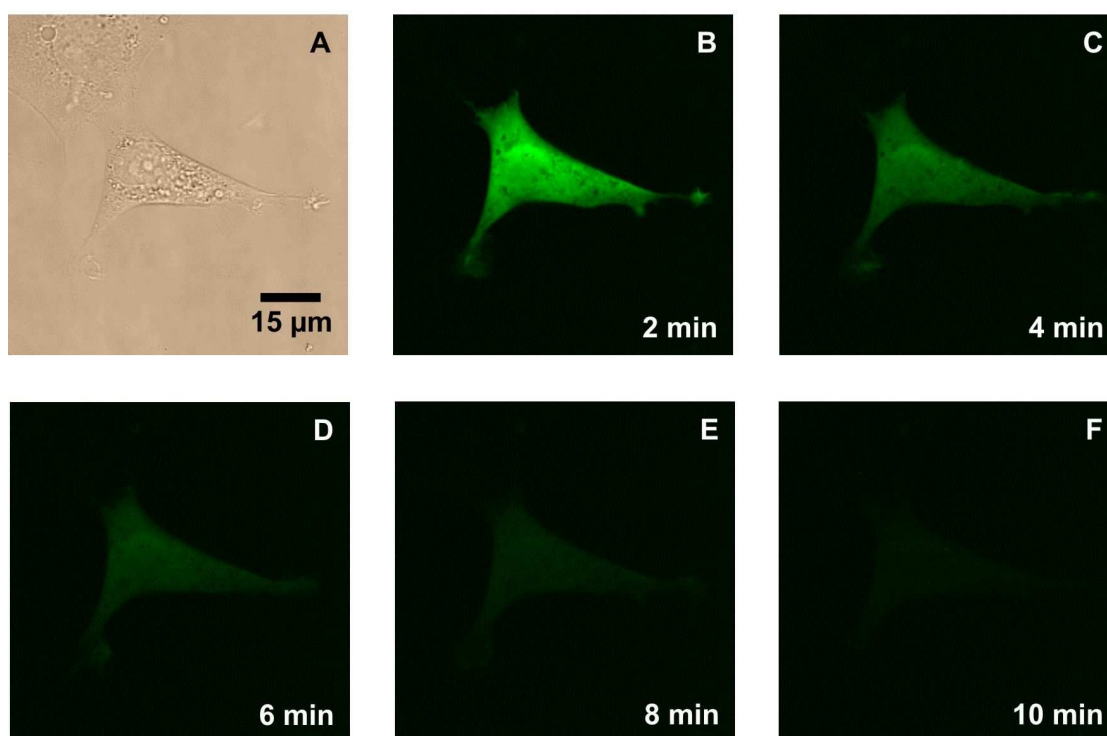


Abbildung 4.1.8: Mit Kcv-GFP transfizierter 3T3-Fibroblast. (A) Durchlichtbild, (B) Fluoreszenzbild nach 2 min, (C) 4 min, (D) 6 min, (E) 8 min, (F) 10 min. Durchgehende Belichtung mit dem Laser (Integrationszeit 15 ms / Pixel).

Die Fluoreszenzintensität wird mit der Dauer der Anregung bzw. Belichtung schwächer, bis nach 10 min nahezu keine fluoreszenten Moleküle verbleiben. Bereits nach 4 min tritt

eine erhebliche Schwächung des Fluoreszenzsignals auf. Da die Messungen für die bildgebende Diffusionsmikroskopie, je nach Größe und Auflösung des Bildausschnittes, zumeist länger als 5 min dauern, fällt GFP als Fluoreszenzmarker für die bildgebende Diffusionsmikroskopie aus. Bei der Bestimmung der Diffusionszeiten verursacht das zusätzliche Bleichen in der Korrelationsfunktion eine Verkürzung der Diffusionszeit. Dies erschwert es, über die gesamte Dauer der Messung einheitliche Werte zu erhalten, weshalb eine primäre Aufgabe darin bestand, besser geeignete Fluoreszenzmarker zu finden. Diese sollten einerseits photostabiler als GFP sein und andererseits das zu untersuchende Protein spezifisch und möglichst einfach markieren. Neben den Farbstoffeigenschaften müssen allerdings auch die Einflüsse der DIFIM-Messparameter auf die Diffusionszeiten untersucht werden.

4.2. EINFLUSS DER INTEGRATIONSZEIT UND AUFLÖSUNG AUF DIE DIFFUSIONSZEIT

An dieser Stelle sollen messtechnische Einflüsse auf DIFIM ausführlich beschrieben werden. So ist es für die Auswertung und besonders für die Vergleichbarkeit der Diffusionsbilder von besonderem Interesse, ob die bei der Messung eingestellte Integrationszeit oder die verwendete Auflösung einen Einfluss auf die Diffusionszeit bewirken.

Um das zu untersuchen, wurde eine Lösung des Farbstoffes Atto 565 hergestellt und diese bei einer gleichbleibenden Konzentration von $5 \cdot 10^{-10}$ mol/l und einer Laserintensität von 75 μ W bei verschiedenen Auflösungen und Integrationszeiten mit DIFIM gemessen.

4.2.1. Einfluss der Integrationszeit

Um den Einfluss der Integrationszeit genauer zu untersuchen, wurden Fluoreszenzintensitätsbilder bei gleichbleibender Auflösung mit unterschiedlichen Integrationszeiten zwischen 25 und 200 ms aufgenommen. In Abbildung 4.2.1 sind die Fluoreszenzintensitäts- und die korrespondierenden Diffusionsbilder für eine Auflösung von 50 nm pro Pixel gezeigt.

Die Fluoreszenzintensitätsbilder veranschaulichen, dass die Zählraten für verschiedene Integrationszeiten um etwa 10 kHz liegen, wobei die Pixelintensitäten bei kurzen Integrationszeiten heterogener sind als bei langen.

Zur genaueren Analyse wurden die einzelnen Pixel statistisch analysiert. In Abbildung 4.2.2 ist die Verteilung von Intensitäten und Diffusionszeiten bei verschiedenen Integrationszeiten visualisiert. Für kurze Integrationszeiten ergeben sich um bis zu 20% höhere Intensitäten als für mittlere, während die Intensitäten bei langen Integrationszeiten entsprechend geringer sind. Dies deutet auf eine Photozerstörung des Farbstoffes hin. Weiterhin werden die Intensitätsverteilungen mit längeren Integrationszeiten schmaler. Die Verbreiterung ist dadurch zu erklären, dass bei einer kurzen Integrationszeit weniger Photonen detektiert werden als bei längeren. Dadurch kommt es zu einer schlechteren Statistik und zunehmenden Fehlsignalen (Rauschen) in den Daten.

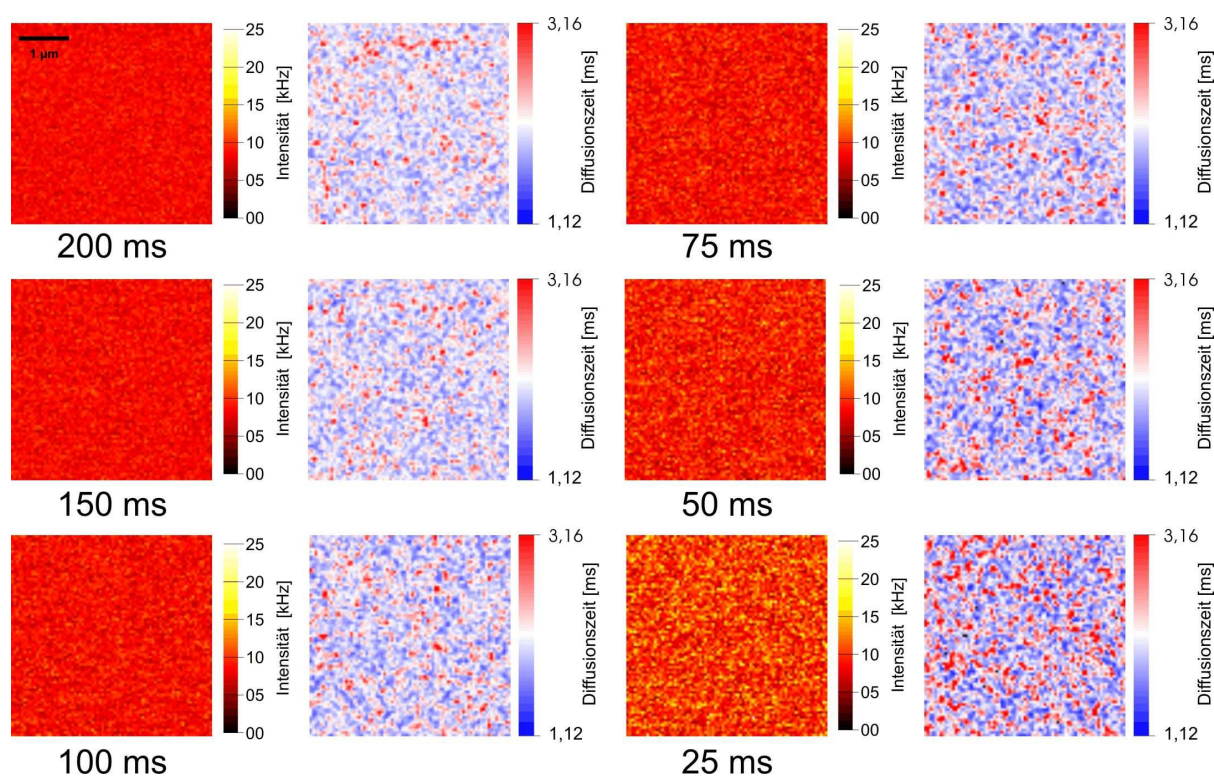


Abbildung 4.2.1: Fluoreszenzintensitäts- und Diffusionszeitbilder einer 50 nM Atto 565 Farbstofflösung für verschiedene Integrationszeiten. $4 \times 4 \mu\text{m}^2$, Auflösung 50 nm / Pixel, Laserintensität $75 \mu\text{W}$.

Wichtig für diese Arbeit ist jedoch primär nicht die gemessene Intensität, sondern die Verlässlichkeit und damit die Vergleichbarkeit von Diffusionszeiten.

Die Diffusionsbilder aus Abbildung 4.2.1 sind sehr ähnlich und belegen, dass die Diffusionszeit von der Integrationszeit kaum abhängig ist. Allenfalls erhöht sich, als Resultat aus den Intensitätsschwankungen, die Heterogenität der Diffusionszeiten zu kürzeren Integrationszeiten.

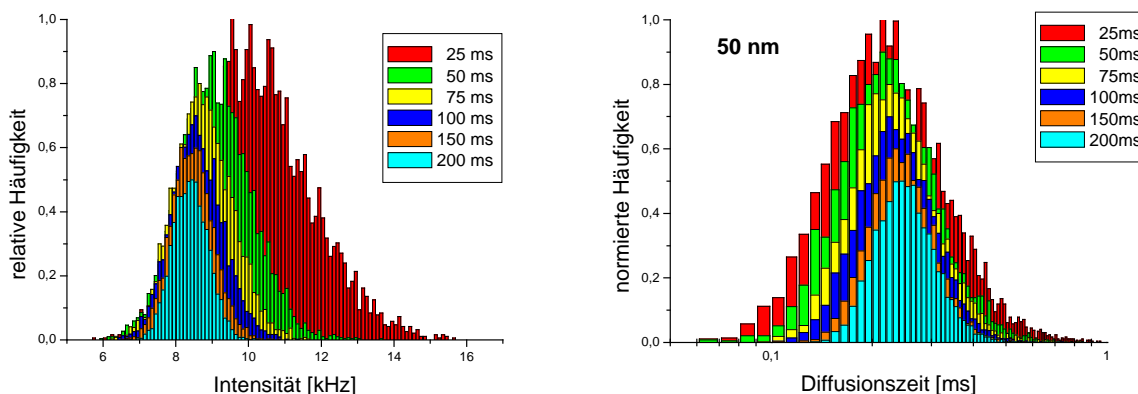


Abbildung 4.2.2: Häufigkeitsverteilungen der bereits in Abbildung 4.2.1 gezeigten Intensitäten (links) und Diffusionszeiten (rechts) für verschiedene Integrationszeiten (25 – 200 ms). Auflösung: 50 nm / Pixel. Die einzelnen Histogramme sind, um eine bessere Übersicht zu erhalten, auf unterschiedliche Maxima normiert.

Die Statistik der Diffusionsbilder (Abbildung 4.2.2) belegt diese Vermutung: Die Halbwertsbreite der Histogramme ist bei kurzen Integrationszeiten breiter. Weiterhin zeigen die Histogramme, dass sich die mittleren Diffusionszeiten mit steigender Integrationszeit zu längeren Werten verschieben. Die Verschiebung ist im Bereich weniger Zehntel Millisekunden, d. h. die mittlere Diffusionszeit liegt bei einer Integrationszeit von 25 ms etwa bei 0,21 ms, bei 200 ms bei 0,25 ms. Zur Fehlerbetrachtung wurde ein Gaußprofil an die Daten angepasst, wobei die Standardabweichung σ als Fehler angenommen wurde. Für eine Integrationszeit von 25 ms ergibt sich eine Standardabweichung von 0,17 ms, für 200 ms eine kleinere von 0,10 ms. Das heißt mit zunehmender Integrationszeit verringert sich der Fehler, was durch das geringere Schwanken der Datenpunkte erklärt werden kann. In allen Fällen liegt die berechnete Diffusionszeit innerhalb der Standardabweichung σ von maximal 0,17 ms für eine Integrationszeit von 25 ms. Demzufolge liegt die Verschiebung der Diffusionszeit, die durch das Variieren der Integrationszeit zustande kommt, innerhalb der normalen Abweichung. Die mithilfe von DIFIM gewonnenen Daten unterliegen also einem stärkeren Rauschen bzw. die Fluktuationen in der Diffusionszeit sind größer, als der Fehler, der durch eine gewählte andere Integrationszeit entsteht.

Die Verschiebung der Diffusionszeit in Abbildung 4.2.2 ist durch die schlechte Photonenstatistik zu erklären. Durch die, für Fluoreszenz-Korrelationsmessungen sehr kurzen Integrationszeiten, wird nur eine geringe Photonenanzahl detektiert. Dies wirkt sich durch ein erhöhtes Rauschen in den Korrelationsfunktionen aus.

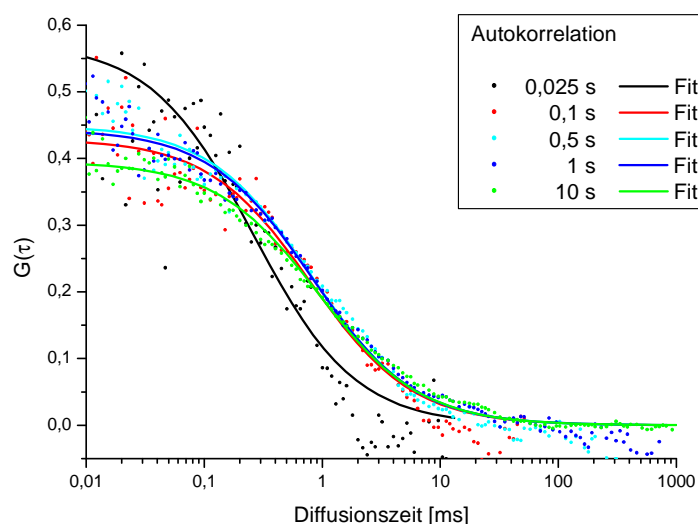


Abbildung 4.2.3: Korrelationskurven und die dazugehörigen zweidimensionalen Fit-Kurven eines farbstoffgekoppelten Oligonukleotids (dT_{20} -TMR) für verschiedene Integrationszeiten (25 ms bis 10 s).

Abbildung 4.2.3 zeigt die Diffusionszeiten einer farbstoffmarkierten Oligonukleotid-Lösung für verschiedene Korrelationszeiten. Die Korrelationspunkte streuen bei kürzeren Integrationszeiten im Bereich kürzerer Diffusionszeiten von 0,01 – 0,1 ms viel stärker als bei längeren. Zusätzlich sind die Messwerte für eine Integrationszeit von 25 ms/Pixel zu kleineren Diffusionszeiten verschoben. So liegt die mittlere Diffusionszeit für eine Integrationszeit von 25 ms bei 0,26 ms, während sie bereits bei einer Integrationszeit von 100 ms bei 0,79 ms liegt. Durch Verlängerung dieser Integrationszeit verändert sich die Diffusionszeit unwesentlich und schwankt um 0,1 ms. Bei den DIFIM-Messungen sollte daher darauf geachtet werden, dass eine Integrationszeit von mindestens 100 ms verwendet wird, da hier die statistischen Schwankungen wesentlich geringer sind als bei kleineren Integrationszeiten. Die so erhaltenen Diffusionswerte entsprechen den, durch Standard-FCS-Messungen bestimmten Werten am Besten.

4.2.2. Einfluss der Auflösung

Um Erkenntnisse über den Einfluss der Auflösung auf die Diffusionszeit zu erhalten, wurden identische Farbstofflösungen untersucht, die bereits für die Integrationszeituntersuchungen verwendet wurden (Kapitel 4.2.1).

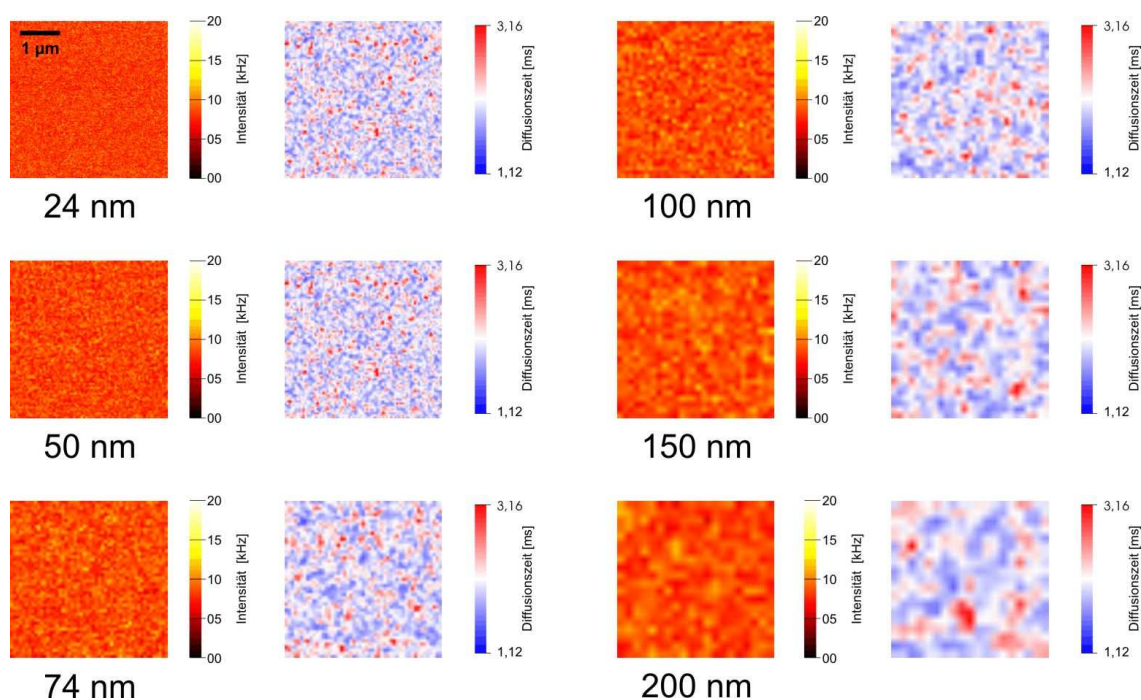


Abbildung 4.2.4: Fluoreszenzintensitäts- und Diffusionsbilder einer 50 nM Atto 565 Farbstofflösung für verschiedene Auflösungen. $4 \times 4 \mu\text{m}^2$, Integrationszeit 150 ms/Pixel, Laserintensität $75 \mu\text{W}$.

In diesem Fall wurden Aufnahmen bei unterschiedlichen Auflösungen von 25 bis 200 nm und festgelegten Integrationszeiten durchgeführt. In Abbildung 4.2.4 sind die Intensitäts- und zugehörigen Diffusionsbilder für eine Integrationszeit von 150 ms / Pixel gezeigt. Die Intensität bleibt während der Messung erwartungsgemäß konstant, da weder die Anregungsintensität, noch die Konzentration verändert wurde. Die Diffusionszeitbilder zeigen keine Unterschiede in der Diffusionszeit und geben eine relativ homogene Verteilung der Zeiten wieder. Um den Einfluss der Auflösung zu verdeutlichen, wurden die einzelnen Diffusionszeiten wiederum in ein Häufigkeitsdiagramm übertragen. Abbildung 4.2.5 zeigt die Verteilung exemplarisch für eine Integrationszeit von 150 ms / Pixel. Die Histogramme sind ebenfalls für eine bessere Übersicht auf unterschiedliche Maxima normiert.

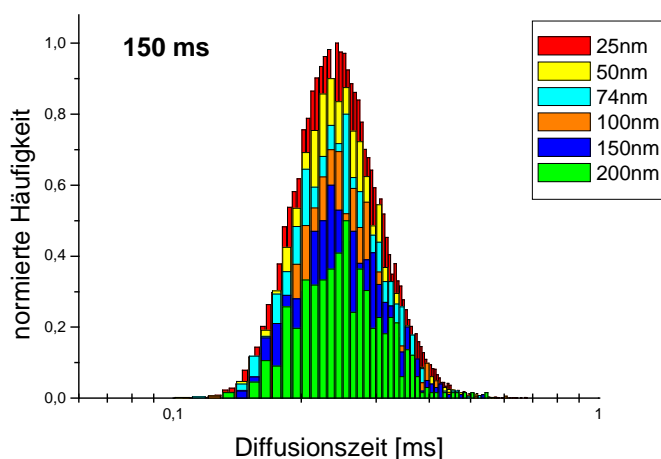


Abbildung 4.2.5: Häufigkeitsverteilungen der bereits in Abbildung 4.2.4 gezeigten Diffusionszeiten für verschiedene Auflösungen (25 – 200 nm). Integrationszeit: 150 ms/Pixel. Die einzelnen Histogramme sind, um eine bessere Übersicht zu erhalten, auf unterschiedliche Maxima normiert.

Das Histogramm zeigt, dass die mittlere Diffusionszeit, d. h. die Maxima der Verteilungen bei 0,24 ms übereinanderliegen. Die Verteilung, repräsentiert durch die Breite der Histogramme, ist ebenfalls sehr ähnlich. Dies verdeutlicht, dass die Auflösung keinen bedeutenden Einfluss auf die Diffusionszeit besitzt. Für die DIFIM-Aufnahmen und den Vergleich der Ergebnisse mehrerer Messungen müssen deshalb keine Korrekturfaktoren eingeführt werden, wenn die Auflösung geändert wird.

4.3. FLUORESZENZMARKIERUNG VON PROTEINEN

Gegenwärtig werden Proteine für biologische Zelluntersuchungen vorzugsweise mit fluoreszierenden Proteinen, wie z. B. GFP, YFP oder CFP, markiert. Die Verwendung ist mittlerweile so populär, dass 2008 der Nobelpreis für Chemie an die drei Entdecker dieser Marker ging [www 3]. Die Verwendung dieser Proteine hat den Vorteil, dass es sich um rein biologische Moleküle handelt, die auf die Proteinfunktionalität nur wenig Einfluss haben [Tsien 1998]. Allerdings sind die Proteine gegenüber synthetischen Farbstoffen relativ photolabil, weshalb ihre Anwendung für die Einzelmolekülspektroskopie und bildgebende Diffusionsmikroskopie bislang begrenzt ist. Durch die Entwicklung bzw. Modifizierung von sogenannten *SNAP-Tags* [Keppler 2004], ist eine innovative Möglichkeit der Proteinmarkierung gegeben, die es erlaubt, synthetische Farbstoffe kovalent an gewünschte Proteine zu koppeln. Der *SNAP-Tag*

leitet sich vom humanen DNA-Reparaturprotein O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (hAGT) ab. Ein Vorteil des *SNAP-Tags* gegenüber GFP (27 kDa) ist seine geringere Masse von etwa 20 kDa.

Der *SNAP-Tag* erlaubt es, synthetische Farbstoffe mit spezifischeren Eigenschaften, insbesondere mit hoher Photostabilität einzusetzen. Leider weisen Farbstoffe oftmals zelltoxische Eigenschaften auf, deren Ausmaß auf jedes Zellsystem einzeln untersucht werden muss [Tokalov 2004].

Die Kombination aus *SNAP-Tag* und Farbstoff ermöglicht es, weitere Parameter, wie z. B. die Fluoreszenzlöschung bestimmter Farbstoffe durch Guanin auszunutzen und dadurch gegenüber zelleigener Fluoreszenz besser diskriminieren zu können.

Im Folgenden soll die Proteinmarkierung in Zellen über *SNAP-Tags* mit Farbstoffen im roten Wellenlängenbereich des sichtbaren Spektrums beschrieben werden.

4.3.1. Auswahl der Farbstoffe und Markierung von Fibroblasten

Die Autofluoreszenz von Zellen tritt im roten Bereich des Spektrums deutlich weniger stark auf als z. B. im blauen [Alberti 1987]. Deshalb wurden für die Messungen Farbstoffe ausgewählt, die in diesem Spektralbereich Fluoreszenz emittieren. Wie bereits im vorigen Kapitel angesprochen, wurden Farbstoffe mit einer hohen Photostabilität gewählt [Heinlein 2004], die für den Einsatz in der Bildgebenden Diffusionsmikroskopie notwendig ist.

Farbstoff	Absorption λ_{ex} [nm]	Emission λ_{em} [nm]	Derivat	Extinktionskoeffizient ϵ [l·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹]
Atto 620	619	643	Carbopyronin	120 000
Atto 633	629	657	Carbopyronin	120 000
CY 5	646	664	Cyanin	250 000
Atto 647N	644	669	Carborhodamin	150 000
MR 121	660	675	Oxazin	125 000

Tabelle 4.3.1: Spektrale Daten der verwendeten Farbstoffe. Die entsprechenden Strukturen sind, soweit veröffentlicht, in Kapitel 7.2 dargestellt.

Der Farbstoff MR 121 besitzt zusätzlich eine nützliche Eigenschaft, da er durch die räumliche Nähe zur Nukleobase Guanin in seiner Fluoreszenzemission gelöscht wird

[Seidel 1996; Knemeyer 2000]. Dies ermöglicht es, innerhalb von Zellen zwischen gebundenen von ungebundenen Substraten zu unterscheiden [Stöhr 2008].

Tabelle 4.3.1 zeigt einen Überblick über die verwendeten Farbstoffe:

Die Farbstoffe wurden zunächst an Benzylguanin gekoppelt, welches in der Lage ist, mit dem *SNAP-Tag* zu reagieren. Der Farbstoff wird so kovalent an das gewünschte Protein gebunden.

In vorherigen Experimenten [Stöhr 2008] wurde die Markierung des *SNAP-Tag* in *E. coli* Bakterien erfolgreich untersucht. Dort zeigte sich, dass nahezu alle Farbstoffe in der Lage sind, die Membran zu durchdringen und den *SNAP-Tag* effektiv zu markieren.

In Analogie wurden für diese Arbeit lebende Säugerzellen mit einem Fusionsprotein aus *SNAP-Tag* und dem Kalium Kanal (Kcv) über Nacht transfiziert. Kcv, der durch das *Paramecium bursaria chlorella virus* (PBCV-1) kodiert wird, ist mit seinen 94 Aminosäuren (Monomer) das kleinste bekannte Protein, das einen funktionierenden Kaliumkanal formen kann [Balss 2008; Plugge 2000]. Dieses Protein gelangt über den Sekretorischen Pfad zur Plasmamembran, wo es nach Einbau in die Membran über Patch-Clamp Experimente nachgewiesen werden kann [Neher 1976]. Hierbei wird die Leitfähigkeitsänderung, indirekt über Anlegen einer Spannung und Beobachtung der Änderung der Stromstärke im Bereich von 10^{-12} A, beim Einbau des Proteins in die Membran gemessen.

Um eine detailliertere Vorstellung zu bekommen, welche Strukturen bei der Anfärbung des Kaliumkanals mit den synthetischen Farbstoffen entstehen, wurde ein Konstrukt aus KcV und GFP in Zellmembranen eingebaut. In Abbildung 4.3.1 ist ein typisches Fluoreszenzverteilungsbild einer Zelle, die mit Kcv-GFP transfiziert wurde, gezeigt. Charakteristisch für den Kanal ist der hell fluoreszierende Ring um den Zellkern, der selbst durch eine geringe Fluoreszenzintensität auffällt. Dieser Ring, wie auch die mikrotubuliähnliche Verteilung, bestätigen den Einbau des Kanals in die Kernmembran [Balss 2008]. Zusätzlich wird eine Anfärbung in unmittelbarer Nähe zum Zellkern beobachtet, die dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) zugeordnet werden kann. Dieses besitzt eine große Membranoberfläche, die einen Großteil des Membranvolumens einer Zelle ausmacht. Das ER ist je nach Zelltyp unterschiedlich



Abbildung 4.3.1:
Fluoreszenzverteilung einer mit Kcv-GFP transfizierten Zelle.

stark ausgeprägt und erstreckt sich bis ins Zytoplasma. Abbildung 4.3.2 zeigt ein Kolokalisationsbild einer mit Kcv-GFP und ER-Tracker-Red markierten Zelle. ER-Tracker Red ist ein Boraindazen-Farbstoff, der spezifisch das Endoplasmatische Retikulum anfärbt. Im Bild ist dieser durch die rote Färbung der Zellen zu erkennen. Die gelblich-grüne Färbung kommt durch Überlagerung der beiden einzelnen Fluoreszenzbilder (grün → GFP, rot → ER-Tracker) zustande und demonstriert eine gute Kolokalisation beider Farbstoffe. Das Bild zeigt weiterhin, dass der ER-Tracker jede Zelle anfärbt,

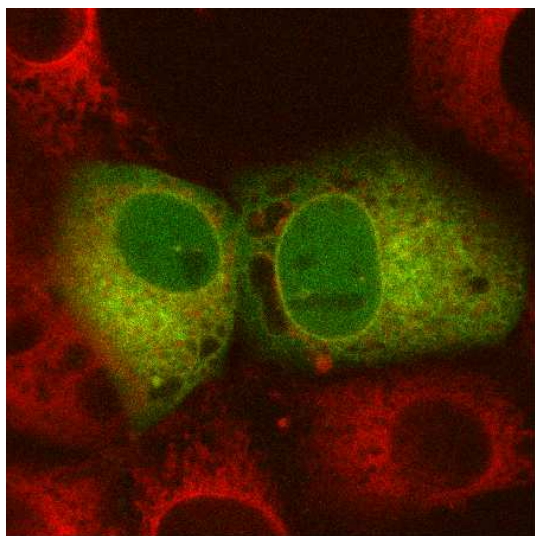


Abbildung 4.3.2: Fluoreszenzbild von NIH-3T3 Fibroblasten, die sowohl mit Kcv-GFP (grün) als auch mit ER-Tracker-Red (rot) markiert wurden.

wohingegen die Transfektion des Kcv-GFP mithilfe von Lipofectamine 2000 nicht vollständig ist, d. h. nicht alle Zellen wurden transfiziert. Diese Eigenschaft ist literaturbekannt und soll hier nicht detailliert diskutiert werden [Invitrogen 2008-a]. Demnach ist der Kaliumkanal nicht nur in der Kernmembran zu finden, sondern ebenfalls in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums. Dies soll für nachfolgende Messungen mit dem Kcv-SNAP-Tag berücksichtigt werden.

Um herauszufinden, ob es möglich ist, den SNAP-Tag und damit den Kaliumkanal in lebenden Säugerzellen spezifisch mit

synthetischen Farbstoffen zu markieren, wurden mit Kcv-SNAP-Tag transfizierte Fibroblasten mit einer 1 μ M Lösung des farbstoffmarkierten Benzylguanins behandelt. Nach zwei Stunden Inkubationszeit wurde zweimal für zehn Minuten mit Medium gewaschen, um überschüssiges bzw. ungebundenes Substrat zu entfernen und das spezifische Signal dieser Proben zu optimieren. In Abbildung 4.3.3. sind exemplarisch zwei der fünf untersuchten Farbstoffe (Atto 633: A-D, MR 121: E-H) mit ihren zugehörigen Durchlicht- und Fluoreszenzbildern dargestellt.

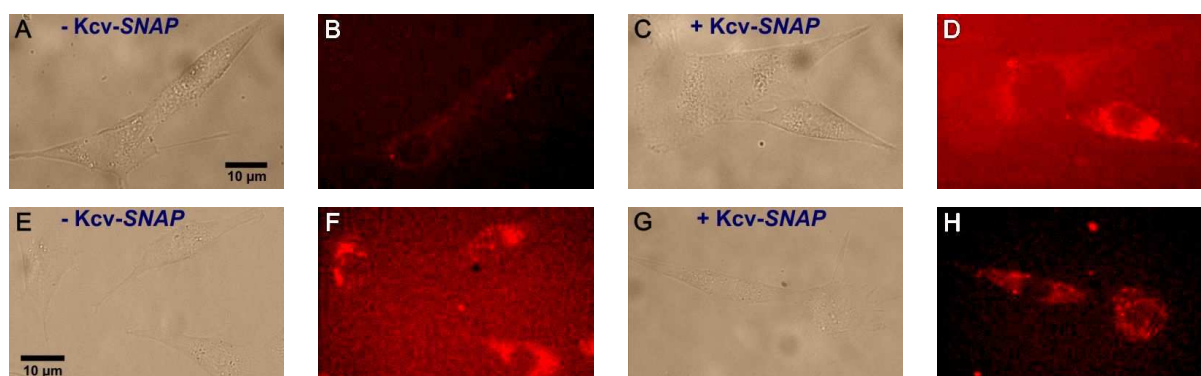


Abbildung 4.3.3: Durchlicht- und Fluoreszenzbilder der nicht transfizierten (A, B und E, F, Blindproben) und der mit SNAP-Kcv transfizierten (C, D und G, H) Zellen. A-D wurden mit BG-Atto 633, E-H wurden mit BG-MR 121 inkubiert.

Bei beiden Proben ist ein Unterschied in den Fluoreszenzintensitäten zwischen der Blind- und der transfizierten Probe zu erkennen. Der Farbstoff Atto 633 (Abbildungen A-D) zeigt in der Blindprobe ein geringes Fluoreszenzsignal, während in der transfizierten Probe eine erhöhte Intensität auftritt. Beim Farbstoff MR 121 ist die transfizierte Probe ebenfalls stärker fluoreszenzent als die Blindprobe. Die Fluoreszenz befindet sich im Zytoplasma, wo sich der Kalium-Kanal Kcv befindet. Allerdings fehlt der charakteristische Ring um den Zellkern, der eine spezifische Markierung von Kcv anzeigt. Vor allem ist kein Unterschied in der Verteilung der Fluoreszenzintensitäten zwischen den mit *SNAP-Tag* transfizierten Zellen und den unbehandelten Zellen festzustellen, die beide mit dem BG-Farbstoff behandelt wurden. Lediglich die Fluoreszenzantwort ist bei den transfizierten Proben geringfügig stärker.

Die Beobachtungen traten mit allen getesteten Farbstoffen reproduzierbar auf. Nahezu 100 % der Zellen zeigen nach der Markierung Fluoreszenz. Mithilfe von Lipofectamine 2000 ist es allerdings nicht möglich, eine Transfektionseffizienz von 100 % zu erhalten. Vielmehr werden nur Effizienzen von 20-90 % erreicht [Invitrogen 2008-a]. Folglich sollten, entgegen den erhaltenen Resultaten, nicht alle Zellen transfiziert werden und nur ein Prozentsatz von 50-90 % der Zellen (Erfahrungswert für Fibroblasten) sollte Fluoreszenz zeigen. Das bedeutet, dass der Farbstoff zwar in die Zelle gelangt, dort allerdings eine unspezifische Bindung eingeht und den *SNAP-Tag* nicht anfärbt.

Für die unspezifische Markierung kommen unterschiedliche Ursachen infrage. Es könnte beispielsweise die Markierung des *SNAP-Tag* am Kaliumkanal oder die Transfektion der Zellen mit dem Fusionsprotein misslungen sein. Weiterhin wurde herausgefunden, dass unspezifische Signale innerhalb der Zelle durch längere Waschschrte nicht reduziert werden können. Unter Umständen binden die relativ lipophilen Farbstoffe vorzugsweise

an die gleichfalls lipophile Membran innerhalb der Zelle, aber nicht spezifisch an den *SNAP-Tag*.

Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Transfektion nicht erfolgreich war. Um dies auszuschließen, wäre es von Vorteil einen bicistronischen Vektor, d. h. ein Plasmid das sowohl den *SNAP-Tag* trägt, als auch einen Fluoreszenzmarker wie z. B. GFP, zu haben, um zu überprüfen, welche Zelle transfiziert wurde. Dies stand zum Zeitpunkt der Messungen jedoch nicht zur Verfügung, weshalb für weitere Messungen eine, mit dem *SNAP-Tag* stabil transfizierte Zelllinie verwendet wurde.

4.3.2. Markierung von Hamsterovarien mit Benzylguanin-Substraten

Um sicherzustellen, dass die unspezifische Markierung nicht an der Transfektion der Zellen mit dem Kaliumkanal-*SNAP-Tag* oder am Zelltyp liegt, wurden stabil transfizierte Hamsterovarien verwendet. In diesen Zellen befindet sich der *SNAP-Tag* am AGT-Histon 2B, welches im Zellkern exprimiert wird. Histone sind Bestandteile des Chromatins und bei der Verpackung und teilweise für die Expression mancher Gene von großer Bedeutung. In den Experimenten trägt jede Zelle den *SNAP-Tag* und die Unsicherheit, ob die gerade gemessene Zelle transfiziert wurde, entfällt.

Die Zellen (CHO-H2B) wurden, zwei Tage vor der Messung gesät und wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben behandelt. Die farbstoffmarkierten Zellen wurden an einem Leica SP5 Mikroskop untersucht, wobei die Farbstoffe jeweils an ihren Absorptionsmaxima angeregt wurden. Die Laserintensität betrug jeweils 80 % der Maximalleistung, der Emissionsfilter wurde 10 nm nach dem Absorptionsmaximum geöffnet und hatte eine Bandbreite von 60 nm.

In Abbildung 4.3.4 sind zwei der Farbstoffe exemplarisch gezeigt. Ein Überblick über alle getesteten Farbstoffe befindet sich im Anhang (Kapitel 7.4). Die farbstoffbehandelten Zellen (B, C) zeigen im Vergleich zur Blindprobe (A) eine stärkere Fluoreszenz. Diese beschränkt sich wie zuvor auf das Zytoplasma, wobei sich der *SNAP-Tag* am Histon2B im Zellkern befindet. Bei den Zellproben, die mit BG-Atto 633, BG-CY 5 und BG-MR 121 markiert wurden (nicht dargestellt), ist ebenfalls nur Fluoreszenzsignal im Zytoplasma und keines im Zellkern erkennbar.

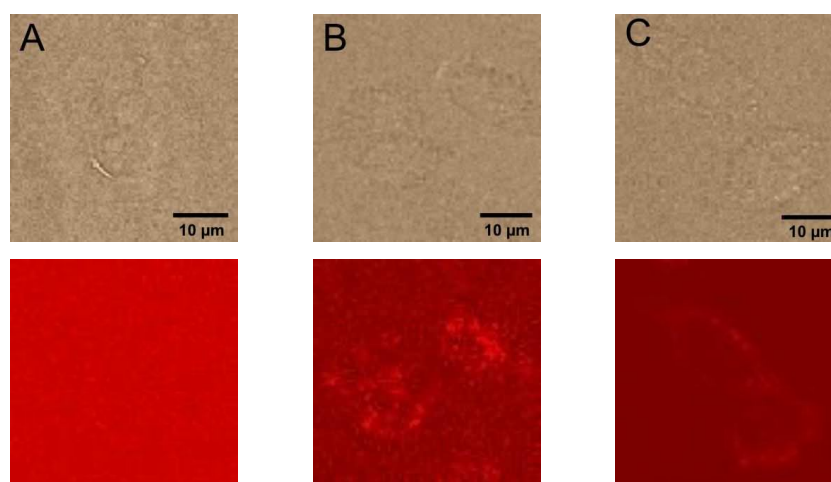


Abbildung 4.3.4: Durchlicht- und Fluoreszenzbilder der mit dem Histon 2B transfizierten Hamsterovarien (CHO-H2B) (A) Blindprobe, (B) BG-Atto 620, (C) BG-Atto 647N.

Im Vergleich der Farbstoffe verursacht BG-Atto 647N die intensivste Färbung, wohingegen mit BG-CY 5 eine sehr geringe Fluoreszenzmarkierung auftritt. Allerdings konnte in allen Fällen nur unspezifische Markierung des *SNAP-Tags* im Zellkern beobachtet werden. Die Fluoreszenz ist nicht homogen, sondern punktförmig im Zytoplasma verteilt. Dies könnte auf eine Markierung über Endozytose hindeuten. Da die Farbstoffe aufgrund ihrer Ringstruktur vornehmlich hydrophoben Charakter besitzen, können die Farbstoffe mit der lipophilen Membran gut wechselwirken. Dort werden sie infolge von Endozytose in Vesikeln bzw. Endosomen und Lysosomen verpackt, von der Membran abgeschnürt und ins Innere der Zelle transportiert. Dort müssten sie, um den *SNAP-Tag* im Zellkern zu markieren, zunächst die Vesikelmembran und anschließend die Kernmembran überwinden. Dies erscheint jedoch aufgrund der relativen Lipophilie der Farbstoffe eher unwahrscheinlich. Hierdurch ergibt sich die Frage, ob es Strukturmerkmale von Farbstoffen gibt, die eine Membrangängigkeit begünstigen oder reduzieren

Ein weiterer Grund für die fehlende Markierung am *SNAP-Tag* könnte sein, dass dieser in der Zelle inaktiv ist. Um diese Annahme zu überprüfen wurde der Farbstoff Carborhodamin 110 (CbR 110), ein Derivat des Farbstoffes Dy 505, an Benzylguanin gekoppelt. Das BG-Substrat dieses Farbstoffes wird von der Firma Covalys als Marker für den *SNAP-Tag* vertrieben und dient somit als Positivprobe. Um etwas über Strukturmerkmale der Farbstoffe zu erfahren, die Einfluss auf Membrangängigkeit haben, wurde Dy 505 auch an Benzylguanin gekoppelt. Dy 505 besitzt im Vergleich zu Carborhodamin 110 eine zusätzliche Alkylkette am Benzylring. Falls die Lipophilie und Größe von Farbstoffen ein Grund für die schlechte Membrangängigkeit ist, sollte Dy 505 im Gegensatz zu CbR 110 schlechter in das Zellinnere gelangen. Die Größe der

Farbstoffe könnte ebenfalls eine Rolle spielen. In beiden Fällen würde der Farbstoff den *SNAP-Tag* im Zellkern nicht anfärben.

Von den behandelten Hamsterovarien wurden Fluoreszenzbilder aufgenommen. Abbildung 4.3.5 zeigt mit BG-Dy 505 und BG-CbR 110 markierte Zellen.

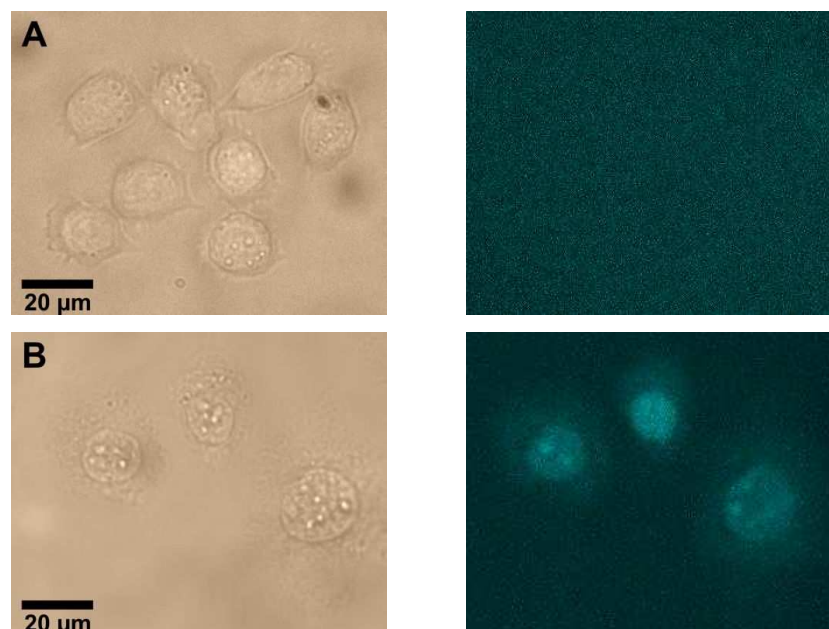


Abbildung 4.3.5: Durchlicht- und Fluoreszenzbild von BG-Dy 505 (A) und BG-CbR 110 (B) inkubierten Hamsterovarien.

Die Bilder verdeutlichen, dass im Falle des Carborhodamin 110 (B) eine Anfärbung im Zellkern stattfindet, im Falle der Markierung mit BG-Dy 505 (A) jedoch nicht. Zusätzlich ist beim CbR 110 eine geringe Anfärbung im Zytoplasma um den Zellkern zu beobachten, die durch Diffusion des unspezifisch gebundenen Substrates aus dem Zellkern interpretiert werden kann. Damit ist gezeigt, dass die unspezifische Markierung nicht an einem inaktiven *SNAP-Tag* lag, sondern tatsächlich durch die verwendeten BG-Farbstoff-Substrate verursacht wurde. Durch Vergleich der Fluoreszenzmarkierung mit dem Farbstoff Dy 505 und den vorherigen roten Farbstoffen wird deutlich, dass im Falle des BG-Dy 505 überhaupt keine Anfärbung der Zelle erfolgt. Offensichtlich treten bei Verwendung verschiedener Farbstoffe vielfältige und sehr komplexe Wechselwirkungen auf. Dies wird auch durch die Tatsache deutlich, dass es für den roten und grünen Spektralbereich zurzeit keine kommerziell erhältlichen *in vivo* Fluoreszenzmarker gibt [Covalys 2008]. Lediglich für den blauen und nahen UV-Wellenlängenbereich werden Farbstoffsubstrate vertrieben. Die Autofluoreszenz der Zellen ist allerdings im roten Spektralbereich wesentlich geringer als die im blauen, weshalb es von besonderem Interesse ist, rote Fluoreszenzfarbstoffe als Marker einzusetzen.

Um zu verstehen, weshalb BG-Carborhodamin 110 in den Zellkern gelangt, BG-Dy 505 hingegen nicht, ist es notwendig, die Struktur der beiden Farbstoffe darauf zu überprüfen, ob es Strukturmerkmale gibt, die eine Membrangängigkeit des Dy 505 verhindern. Abbildung 4.3.6 zeigt die Strukturen der beiden Farbstoffe Carborhodamin 110 und Dy 505:

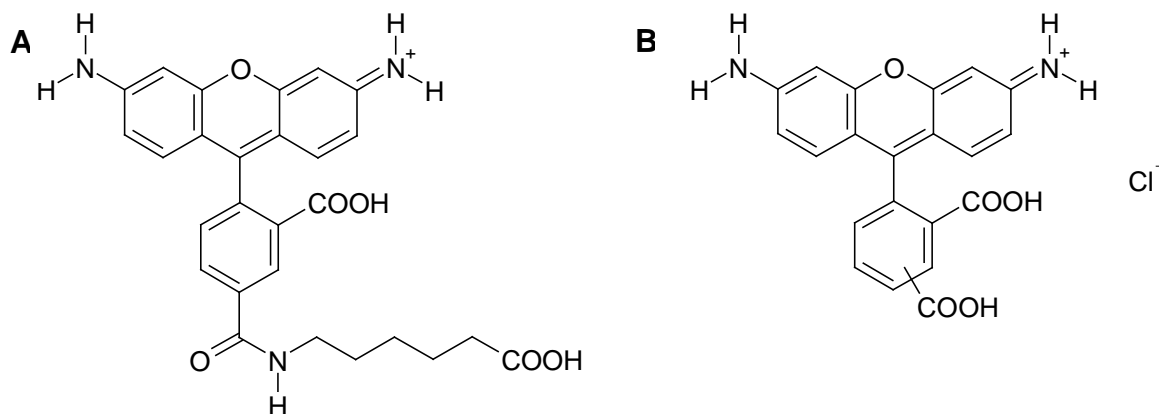


Abbildung 4.3.6: Strukturen der für die Markierung des H2B-SNAP-Tag verwendeten Farbstoffe Dy 505 (A) und Carborhodamin 110 (B).

Dy 505 trägt eine zusätzliche Alkylkette, die über eine Peptidbindung an den Chromophor gebunden ist. Dadurch ist der Farbstoff einerseits größer und sterisch anspruchsvoller als das Carborhodamin 110, andererseits ist er auch lipophiler und kann besser mit der Membran wechselwirken. Da das Äußere der Zellmembran im Gegensatz zur Innenseite hydrophilen Charakter besitzt, ist es für den Durchtritt der Farbstoff-Substrate durch die Membran von Vorteil, Marker mit sowohl hydrophilen als auch lipophilen Eigenschaften zu verwenden. Besitzt der Farbstoff einen zu großen lipophilen Anteil, könnte es sein, dass dieser mit der äußeren Membran wechselwirkt und nicht in der Lage ist, diese zu penetrieren. Im Falle des Farbstoffes Dy 505 lässt sich keine eindeutige Aussage darüber treffen, ob die Größe oder die Lipophilie den Grund für die Nichtmarkierung der Zelle darstellt. In früheren Untersuchungen verschiedener Farbstoffe [Stöhr 2008] in Hamsterovarien wurde festgestellt, dass die Größe des Farbstoffes bzw. des Benzylguanin-Farbstoff-Substrates eine wesentliche Rolle für die Membrangängigkeit und damit für das Färbungspotential spielt. So wurde gezeigt, dass sowohl die Größe der Reste an den Stickstoffatomen, als auch längere aliphatische Seitenketten einen negativen Einfluss auf die Membrangängigkeit der Farbstoffe besitzen. Schon der Austausch eines Fluor- durch ein Chloratom ist ausreichend, dass ersteres noch membrangängig ist, letzteres jedoch nicht mehr in die Zelle gelangen kann. Dies ist im Vergleich zwischen BG-Oregon Green (membrangängig [Mottram

2007]) und BG-TET (Tetrachlorofluorescein, nicht membrangängig) ersichtlich [Stöhr 2008].

Da ausgeschlossen werden kann, dass der *SNAP-Tag* selbst nicht der Grund für die unzureichende Markierung ist, sondern die Struktur und Größe der roten Farbstoffe, wurde nach alternativen Strategien gesucht, die es ermöglichen die BG-Farbstoff-Substrate in Zellen zu schleusen.

4.3.3. Markierung von Hamsterovarien mit Chloropyrimidin-Substraten

Eine Möglichkeit, synthetische, im roten Spektralbereich emittierende Farbstoffe trotz ihrer Strukturnachteile in die Zelle zu schleusen und dafür keine invasiven Methoden, wie z. B. Mikroinjektion oder Elektroporation verwenden zu müssen, ist die Verwendung von 4-(4-(aminomethyl)benzyloxy)-6-chloropyrimidin-2-amin oder kurz CP-NH₂ (Abbildung 4.3.7). Dieses ersetzt bei den bisher vorgestellten Versuchen das Benzylguanin. Analog ist dieses, wie auch Benzylguanin, in der Lage, mit hAGT zu reagieren, ist aber sterisch weniger anspruchsvoll und weist eine kleinere Masse auf.

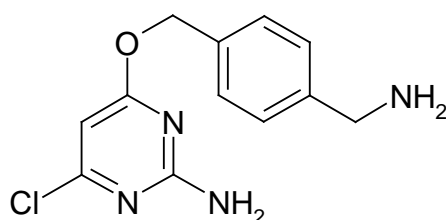


Abbildung 4.3.7: Struktur des CP-NH₂ (4-(4-(aminomethyl)benzyloxy)-6-chloropyrimidin-2-amin).

Verglichen mit Benzylguanin (Abbildung 3.2.2) besitzt das CP-Substrat einen Pyrimidinring, wohingegen dem Benzylguanin ein ausgedehntes Purin-Grundgerüst zugrunde liegt. Demnach fehlt im CP ein Imidazolring und die Struktur ist sterisch nicht mehr so anspruchsvoll. Mit Hilfe dieses Substrates ist es beispielsweise gelungen, den Farbstoff TAMRA (Carboxytetramethylrhodamin) und TMR in Zellen zu schleusen, wohingegen der an Benzylguanin gekoppelte Farbstoff dazu nicht in der Lage war [Stöhr 2008, Covalys 2009].

Im Folgenden soll beschrieben werden, wie die oben getesteten Farbstoffe an CP-NH₂ gekoppelt auf ihre Membrangängigkeit getestet werden.

Für die Untersuchung der Membrangängigkeit der in Tabelle 4.3.1 genannten Farbstoffe, wurden diese zunächst an Chloropyrimidin gekoppelt und über zwei Stunden bei 37 °C

inkubiert. Nachfolgend wurde zweimal mit Medium gewaschen. In Abbildung 4.3.8 ist die Färbung der Zellen für zwei Farbstoffe exemplarisch dargestellt. Ein Überblick über alle getesteten Farbstoffe befindet sich im Anhang (Kapitel 7.4).

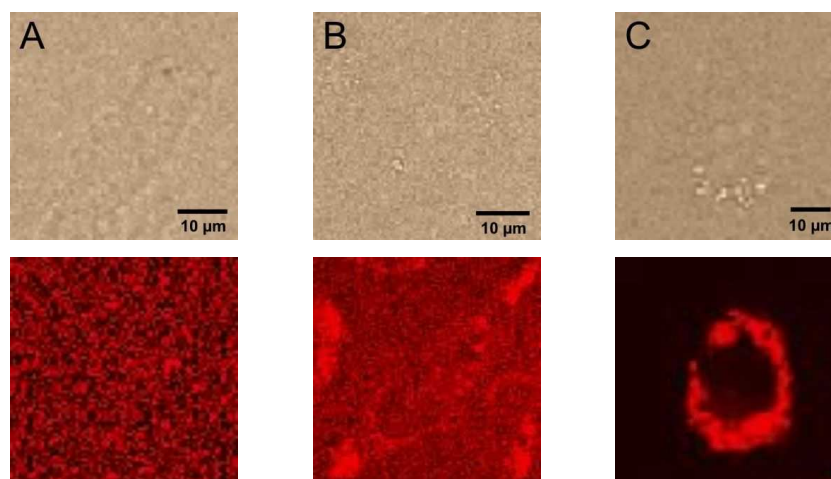


Abbildung 4.3.8: Durchlicht- und Fluoreszenzbilder der mit dem Histon 2B transfizierten Hamsterovarien (CHO-H2B) (A) Blindprobe, (B) CP-MR 121, (C) CP-Atto 647N.

Abbildung 4.3.8 zeigt die Anfärbung des Zytoplasmas durch die Farbstoffsubstrate, während in der Blindprobe keine signifikante Fluoreszenz detektiert wird. Das heißt die Autofluoreszenz der Zelle ist gering. Der *SNAP-Tag*, der sich im Zellkern befindet, wird allerdings auch hier durch die Substrate nicht gefärbt. Des Weiteren ist festzustellen, dass jede Zelle den Farbstoff trägt und die Fluoreszenzintensität, wie im Experiment mit den BG-Substraten, nicht homogen sondern punktförmig im Zytoplasma verteilt ist. Dies könnte ein Indiz für die Aufnahme des CP-Farbstoffes über Endozytose sein.

Um zu überprüfen, ob die Substrate über Endozytose in die Zelle gelangen, wurde ein Kollokalisationsexperiment mit einem Endozytosemarker durchgeführt. Der Farbstoff FM 4-64 (N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino)phenyl)hexatrienyl)pyridiniumdibromid) färbt bevorzugt Membranstrukturen, und ist gut geeignet, um den endozytotischen Pfad zu verfolgen [Invitrogen 2008-b]. Im Folgenden wurden die Hamsterovarien während zwei Stunden mit BG-MR 121 bei 37 °C inkubiert und anschließend gewaschen, um unspezifisch gebundenes Substrat zu entfernen. Aufgrund der schnellen Markierung des FM 4-64 wurde dieser erst 5 Minuten vor der Messung zugegeben. Abbildung 4.3.9 zeigt die erhaltenen Fluoreszenzbilder.

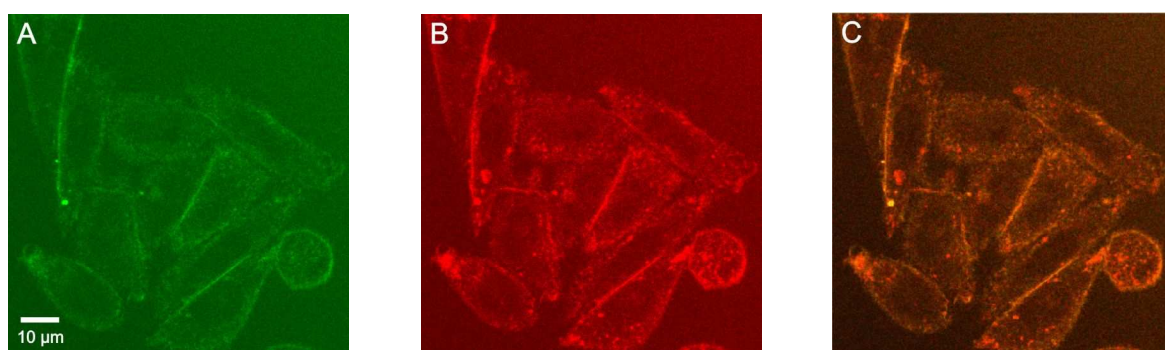


Abbildung 4.3.9: Fluoreszenzbilder der mit dem Histon 2B transfizierten Hamsterovarien (CHO-H2B) (A) FM 4-64, (B) BG-MR 121, (C) Überlagerung beider Aufnahmen.

Die Bilder zeigen alle ein schlechtes Signal-zu-Hintergrundverhältnis, welches eine definitive Aussage über die Kolokalisation erschwert. Abbildung B zeigt die bereits vorher erhaltene punktförmige Anfärbung im Zytoplasma. Zusätzlich ist die Zellmembran angefärbt. Die Fluoreszenz bei FM 4-64 (A) zeigt eine gute Markierung der äußeren Zellmembran. Allerdings bleibt die punktförmige Anfärbung hier aus. Vielmehr ist die Fluoreszenz relativ homogen über das Zytoplasma verteilt. Die Kolokalisationsbilder zeigen zwar eine gelbliche Färbung, die auf Kolokalisation hindeutet, diese ist aber sehr wahrscheinlich auf das schlechte Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis zurückzuführen. Die punktförmige Anfärbung erscheint dagegen weiterhin rot, was gegen eine Kolokalisation spricht. Es könnte sein, dass das Farbstoffsubstrat nicht über Endozytose, sondern auf anderen Wegen in die Zelle geschleust wird, und die punktförmige Markierung könnten Lysosome zeigen, deren Membran durch den Endozytosemarker nicht angefärbt wird. Eine andere Möglichkeit stellt der Unterschied der Inkubationszeit dar. Das BG-MR 121 wurde über zwei Stunden inkubiert, wohingegen FM 4-64 erst kurz vor der Messung zugegeben wurde. Folglich könnte die punktförmige Anfärbung eine Anreicherung des Substrates in Lysosomen darstellen.

Um dies zu überprüfen, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt, bei dem sowohl das BG-Substrat (BG-MR 121) als auch der FM 4-64 über zwei Stunden inkubiert wurden. Die Fluoreszenzbilder sind in Abbildung 4.3.10 gezeigt.

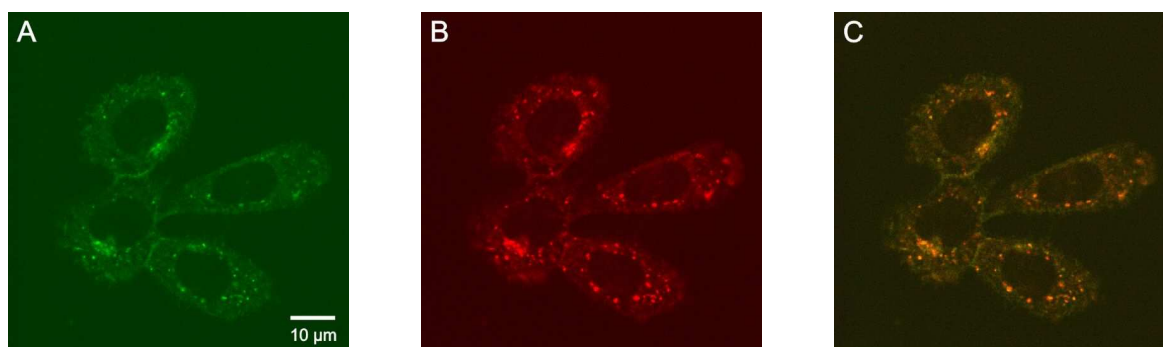


Abbildung 4.3.10: Fluoreszenzbilder der mit dem Histon 2B transfizierten Hamsterovarien (CHO-H2B) (A) FM 4-64, (B) BG-MR 121, (C) Überlagerung beider Aufnahmen.

Hier wird, im Gegensatz zum vorherigen Experiment, sowohl im Falle des FM 4-64 (A) als auch bei BG-MR 121 (B) eine punktförmige Verteilung der Fluoreszenz erhalten. Zusätzlich ist die Färbung der Membran beim Endozytosemarker nicht so stark ausgeprägt. Des Weiteren ist das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis in Falle dieses Experimentes besser, sodass im Kolokalisationsbild (C) die Überlagerung der Fluoreszenz durch die gelbe Färbung erkennbar wird. Das bedeutet, dass die punktförmige Anfärbung im Falle der Inkubation mit den BG- als auch den CP-Substraten durch Anreicherung der Farbstoffsubstrate in Endosomen zustande kommt. Um dies zu verhindern, müsste während der Inkubation die Endozytose effektiv unterdrückt werden. Dies kann durch Abkühlen der Zellen erfolgen, oder durch zusätzlich zugegebene Endozytosehemmer. Erstere Methode hat den Nachteil, dass die lange Inkubationszeit von zwei Stunden nicht realisiert werden kann. Im Falle der Zugabe weiterer Reagenzien muss untersucht werden, welchen Einfluss diese auf die Diffusionsprozesse der zu untersuchenden Signalproteine *in vivo* haben. Dies ist notwendig, um auszuschließen, dass die Endozytosehemmer die natürlichen Bedingungen der Zelle vor allem in Bezug auf die Diffusion der Proteine zu stark beeinflussen.

In Summe zeigen alle Experimente, dass die getesteten Farbstoffe nicht in der Lage sind, das Zielprotein im Zellkern (den *SNAP-Tag*) effektiv anzufärben. Die Verwendung von CP anstelle des BG bringt ebenfalls nicht den erwünschten Vorteil, der im Falle der Farbstoffe TAMRA und TMR erfolgreich war [Stöhr 2008, Covalys 2009]. Eine Möglichkeit könnte sein, dass die Substrate im Zytoplasma in Vesikeln vorliegen, die ebenfalls eine Membranhülle besitzen. Darauf würde die punktförmige Fluoreszenzverteilung in der Zelle hindeuten. Das würde bedeuten, dass die

Farbstoffsubstrate an sich nicht in der Lage sind, die Membran zu überwinden, und nur über zelleigene Prozesse, wie z. B. Endozytose ins Innere gelangen.

Eine Möglichkeit, die Markierung zu verbessern, könnte die Verwendung von Transfektionsreagenzien mit sich bringen, die es auf verschiedene Art und Weisen ermöglichen, auch sterisch anspruchsvolle Moleküle in Zellen und von dort in den Zellkern zu schleusen. Im folgenden Kapitel soll auf diese Möglichkeit näher eingegangen werden.

4.4. MARKIERUNG VON ZELLEN MITHILFE VON TRANSFEKTIONSREAGENZIE

Wie bereits erwähnt ist es möglich, mithilfe von Transfektionsreagenzien sehr große Moleküle, wie z. B. DNA bzw. die DNA verschiedener Fusionsproteine in Zellen zu schleusen. Dies kann auf verschiedene Art und Weisen erfolgen. Lipofectamine 2000 beispielsweise bildet Liposomen und schließt Moleküle ein, um mit der Zell- oder der Kernmembran zu wechselwirken. Dadurch wird DNA in das Zytoplasma, aber auch in den Zellkern transferiert. Eine andere Möglichkeit stellt Streptolysin O dar, welches Löcher bzw. große Poren in der Zellmembran verursacht, durch die DNA in die Zelle gelangen kann.

Im Folgenden wird die Färbung mithilfe derartiger Transfektionsreagenzien beschrieben.

4.4.1. Markierung durch Lipofectamine 2000

Lipofectamine 2000 ist ein kationisches, auf Lipiden basierendes Reagenz, das bevorzugt für die Transfektion negativ geladener Moleküle, beispielsweise DNA verwendet wird. Es ist kaum zelltoxisch und führt im Allgemeinen zu hohen Transfektionsraten [Dalby 2004]. Die negativ geladene DNA wird in Liposomen eingeschlossen, wobei die positiv-geladenen Liposomenköpfe mit der ebenfalls negativ geladenen Membran wechselwirken und den Durchtritt der DNA durch die Membran unterstützen.

Zur Färbung der Zellen wurden die Benzylguanin- bzw. Chloropyrimidin-Farbstofflösungen in der gewünschten Menge (Endkonzentration 1 μ M) mit dem Lipofectamine 2000 vorgemischt, damit sich, den Farbstoff einschließende Liposomen

bilden können. Danach wurden die Zellen zwei Stunden lang mit dieser Lösung inkubiert und zweimal mit Medium gewaschen, um überschüssiges Farbstoffsubstrat auszuwaschen. Die Messungen erfolgten bei den gleichen Bedingungen wie die vorhergehenden Experimente, d. h. mit den gleichen Filtereinstellungen, Anregungswellenlängen und -intensitäten.

Abbildung 4.4.1 zeigt die Markierung der Zellen exemplarisch für die beiden Farbstoffe Atto 633 und MR 121 jeweils als BG- und als CP-Substrat. Die übrigen Farbstoffe finden sich im Anhang unter Kapitel 7.4.

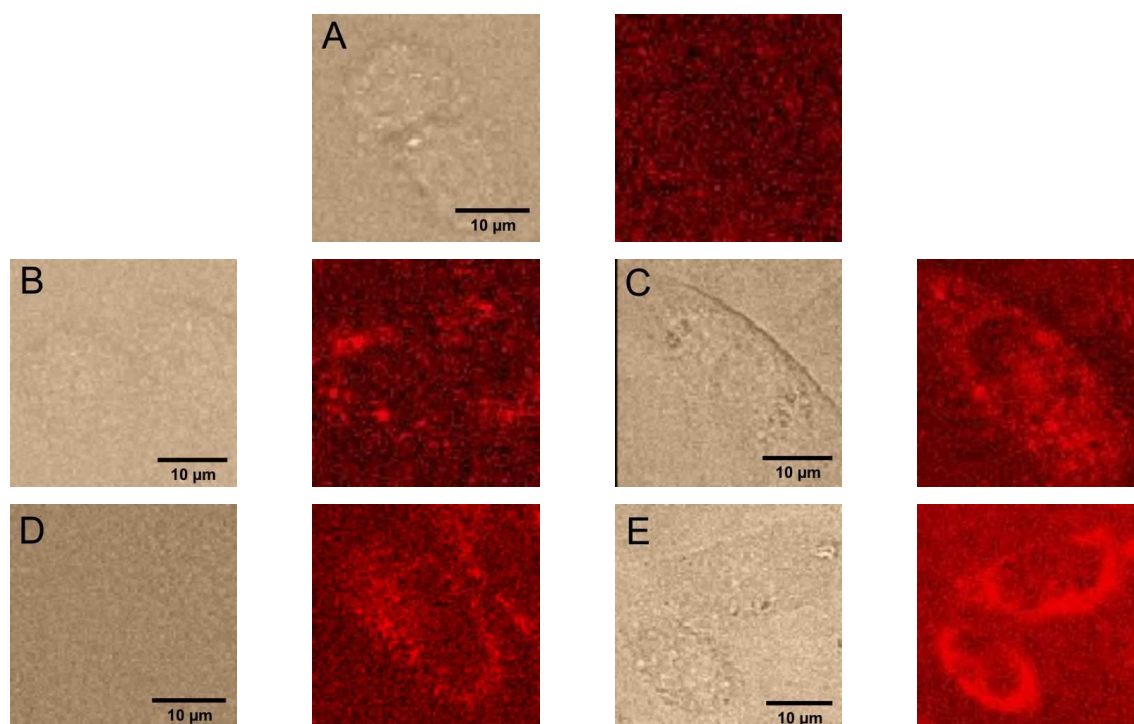


Abbildung 4.4.1: Durchlicht- und Fluoreszenzbilder der mit dem Histon 2B stabil transfizierten Hamsterovarien (CHO-H2B). Die Markierung erfolgte mithilfe von Lipofectamine 2000. (A) Blindprobe, (B) BG-MR 121, (C) BG-Atto 633, (D) CP-MR 121, (E) CP-Atto 633.

Es zeigt sich, dass jede Charge, ausgenommen die Blindproben, Fluoreszenz aufweist. Wie bei den vorherigen Experimenten ist keine Anfärbung im Zellkern zu erkennen. Ebenfalls existiert ein kleiner Helligkeitsunterschied zwischen der Markierung mit BG-MR 121 (B), welches ein gelöscht Substrat darstellt, und dem CP-MR 121 (D). In Abbildung 4.4.1-D ist die Fluoreszenzintensität bei gleichbleibender Anregung etwas höher. Dies zeigt erneut, dass fluoreszenzgelöschte Substrate die störende Hintergrundfluoreszenz deutlich herabsetzen.

Der Vergleich der einzelnen Farbstoffe untereinander bestätigt, wie auch schon in den oben beschriebenen Experimenten gefunden, dass Atto 647N die intensivste Zellfärbung verursacht. Zwischen den Farbstoffen Atto 620, Atto 633 und MR 121 ist kein merklicher

Unterschied. CY 5 dagegen liefert die schlechtesten Werte. Hierauf geben die Farbstoffladungen keinen Hinweis. CY 5 ist der einzig negativ geladene Farbstoff, wohingegen die anderen alle positiv geladen sind. Mit Lipofectamine 2000 als kationischem Reagenz sollte deshalb das negativ geladene BG-CY 5 besser wechselwirken als die vier anderen positiv geladenen BG-Substrate. Scheinbar gibt es neben der Transfektion der Zellen durch Lipofectamine 2000 auch andere Effekte, die die Aufnahme des Substrates bewirken und gleichzeitig den Mechanismus bzw. die Wechselwirkung mit Lipofectamine überlagern. So könnte es möglich sein, dass die kationischen Farbstoffe selbst mit der negativ geladenen Membran wechselwirken und auf diese Weise in die Zelle gelangen. Dafür spricht auch die schlechtere Aufnahme des negativ geladenen BG-CY 5.

Im Vergleich aller Messungen tritt kein signifikanter Unterschied zwischen Benzylguanin- und Chloropyrimidin-Substrat auf. Dies widerspricht den Erwartungen, da das kleinere und sterisch weniger anspruchsvolle Chloropyrimidin eigentlich besser in die Zelle gelangen sollte. Folglich sollte der Farbstoff nicht durch die Poren bzw. Kanäle der Membran in die Zelle gelangen, sondern auf anderen Wegen. Auch die Verwendung von Lipofectamine 2000 führt zu keiner spezifischen Anfärbung. Die Liposomen wechselwirken und fusionieren anschließend mit der Membran und ermöglichen so die Aufnahme des Substrats in die Zelle [Dalby 2004]. Im Falle der Endozytose werden die Farbstoffe auch über Vesikel in die Zelle transportiert. Allerdings wird der Farbstoff nicht, wie im Falle des Lipofectamine 2000, in das Zytoplasma geschleust, sondern befindet sich aufgrund von Vesikelabschnürung innerhalb von sogenannten Endosomen. Weiterhin sind die Markierungsmuster der Anfärbung mit Lipofectamine 2000 und durch Inkubation sehr ähnlich. Dies lässt vermuten, dass der Farbstoff auch im Falle des Lipofectamine 2000 über Endozytose in die Zellen geschleust wird.

Das Experiment hat gezeigt, dass das Transfektionsreagenz Lipofectamine 2000 nicht in der Lage ist, den Farbstoff in den Zellkern zu schleusen, um den dort befindlichen *SNAP-Tag* spezifisch anzufärben. Zusätzlich ist kein Unterschied zwischen den einfach inkubierten und den mit Lipofectamine 2000 behandelten Zellen erkennbar. Die Fluoreszenzbilder unterscheiden sich in der Intensität der Fluoreszenz nicht merklich. Demnach fällt diese Markierung als Alternative aus, da durch reine Inkubation, d. h. ohne Verwendung von eventuell zelltoxischen zusätzlichen Hilfsmitteln dasselbe Ergebnis erzielt wird.

4.4.2. Markierung mithilfe von Streptolysin O

Streptolysin O (SLO) ist in der Lage, Löcher in die Zellmembran zu reißen und ermöglicht dadurch verschiedenen Substraten Zugang in die Zellen. SLO ist ein thiol-aktiviertes, membran-zerstörendes Proteingift mit einer molaren Masse von etwa 69 000 g/mol. Es ist in der Lage an Cholesterol-enthaltende Membranen zu binden und formt nach Anknüpfung gebogene, stäbchenförmige Oligomere, die amphiphil, d. h. sowohl hydrophil als auch hydrophob sind [Bhakdi 1985]. Diese Oligomere durchbrechen die apolaren Bereiche der Membran, wobei die konvexen Seiten apolare Oberflächen besitzen, die mit der Membran in Kontakt stehen. Die konkave Seite ist hydrophil und bildet Kanäle, die die Membran durchziehen. Diese können genutzt werden, um Substrate in die Zelle schleusen [Bhakdi 1985].

Im Folgenden wird beschrieben, wie Streptolysin O dazu verwendet wird, BG- und CP-Substrate in Zellen einzubringen, mit dem Ziel, den im Zellkern befindlichen *SNAP-Tag* spezifisch zu markieren. Die Zellen wurden hierzu jeweils mit zwei Einheiten SLO und der entsprechenden Menge an Farbstoffsubstraten für eine halbe Stunde inkubiert. Anschließend wurde das Medium ausgetauscht, um es den Zellen zu ermöglichen, die Löcher in der Membran auszuheilen und zu regenerieren. Insgesamt 150 min nach Beginn der Markierung – dies entspricht der Zeit, nach der die inkubierten und mit Lipofectamine 2000 behandelten Zellen gemessen wurden – wurde das Fluoreszenzsignal gemessen. Abbildung 4.4.2 zeigt die zugehörigen Durchlicht- und Fluoreszenzbilder jeweils exemplarisch für die zwei Farbstoffe Atto 633 und Atto 647N (Übersicht aller Farbstoffe unter Kapitel 7.4).

Im Vergleich zur Blindprobe ist bei jedem Farbstoff eine Anfärbung zu sehen. Die besten Ergebnisse liefert Atto 647N, sowohl als BG- als auch als CP-Substrat, wobei die Verteilung der Fluoreszenz im Zytoplasma nicht homogen, sondern eher punktförmig ist. Im Falle von BG-Atto 620, BG- und CP-Atto 633 ist die Anfärbung gering, jedoch ist ein schwaches Fluoreszenzsignal im Zytoplasma zu erkennen. Bei den übrigen Farbstoff-Substraten CP-Atto 620, BG- und CP-MR 121 und BG- und CP-CY 5 ist keine Anfärbung der Zellen zu detektieren. Vermutlich ist in der Zelle die Konzentration an Farbstoff zu gering, um sie mit den gleichen Messparametern aus den Vorexperimenten zu detektieren. Diese wurden, um die Markierungsexperimente vergleichen zu können konstant gehalten. Die punktförmige Verteilung der Fluoreszenz weist auf die Verpackung der BG- und CP-Substrate in Lysosomen oder Endosomen hin. Die relativ

lipophilen Farbstoffe binden an die ebenfalls lipophile Membran und werden in Vesikeln verpackt, wo sie im Falle der Lysosomen mithilfe verschiedener Enzyme verdaut werden.

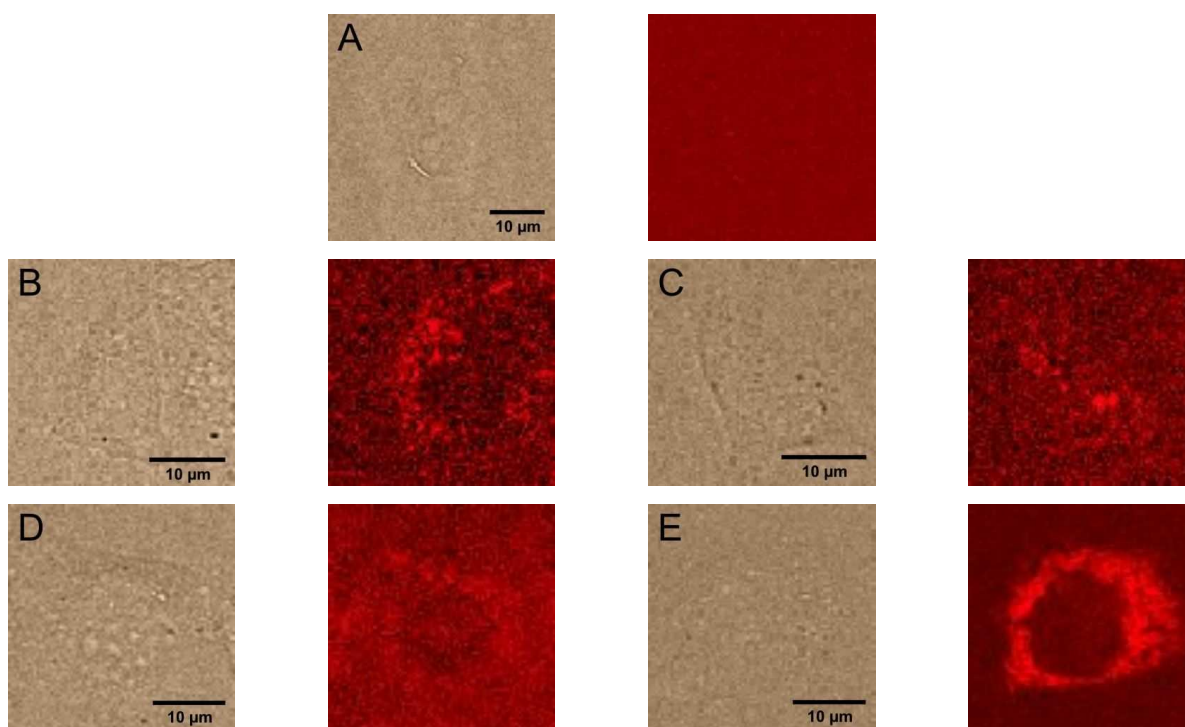


Abbildung 4.4.2: Durchlicht- und Fluoreszenzbilder der mit dem Histon 2B stabil transfizierten Hamsteroovarien (CHO-H2B). Die Markierung erfolgte mithilfe von Streptolysin O. (A) Blindprobe, (B) BG-Atto 633, (C) BG-Atto 647N, (D) CP-Atto 633, (E) CP-Atto 647N.

Im Vergleich der Anfärbung aller drei Methoden erscheint das Fluoreszenzsignal der mit Lipofectamine 2000 behandelten Zellen etwas stärker (Abbildung 4.4.3). Dies könnte daran liegen, dass der Farbstoff im Falle des Streptolysin O während des Ausheilprozesses einen Teil der Farbstoffsubstrate über Exozytose wieder an das Medium abgegeben hat. Dieses wurde direkt vor der Messung ausgetauscht, um ungebundenes Substrat zu reduzieren.

Auch hier zeigte sich, dass die BG- bzw. CP-gekoppelten Farbstoffe nicht in der Lage sind, den *SNAP-Tag* im Zellkern spezifisch anzufärben. Die Anfärbung bleibt in diesem Experiment auf das Zytoplasma beschränkt.

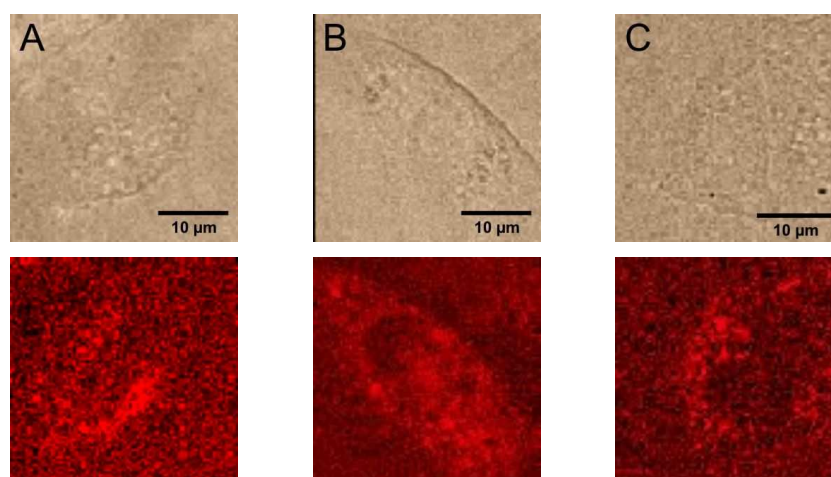


Abbildung 4.4.3: Durchlicht- und Fluoreszenzbilder der mit dem Histon 2B stabil transfizierten Hamsterovarien (CHO-H2B). BG-Atto 633 wurde durch (A) Inkubation (B) Lipofectamine 2000 und (C) Streptolysin O in die Zellen geschleust.

Die Experimente legen nahe, dass die Größe der Farbstoffe und eventuell ihre relative Lipophilie der Grund dafür sind, weshalb die Substrate nicht in den Zellkern gelangen, um den dort befindlichen *SNAP-Tag* zu markieren. Hierbei stellt sich die Frage, wie es möglich ist, dieses Problem durch nichtinvasive Methoden zu umgehen.

Für die Biologie ist es von Bedeutung die physiologischen Bedingungen möglichst wenig zu beeinflussen, damit Informationen über *in vivo* Bedingungen der zu untersuchenden Prozesse gewonnen werden. Jeder Eingriff, unabhängig von der Art und Weise, bedeutet einen Eingriff in den Zellzyklus und bewirkt eventuell Stress für die Zellen. Damit ist es nicht mehr möglich die Zellen unter *in vivo* Bedingungen zu untersuchen, wodurch die Interpretation der gewonnenen Informationen erschwert wird. Mit invasiven Methoden lassen sich dann zwar Diffusionswege verfolgen, allerdings werden zusätzlich zu den gebundenen Substraten auch freie Substrate diffundieren, die die Hintergrundfluoreszenz erhöhen. Dieses Signal muss weiterhin von dem des gebundenen Substrates getrennt werden und erschwert die Auswertungen der Messungen. Somit ist es essentiell, andere Möglichkeiten einer spezifischen Markierung von Proteinen mit genügend photostabilen Farbstoffen zu finden.

In diesem Kapitel ging es hauptsächlich um die Verwendung von synthetischen Farbstoffen, die eine hohe Photostabilität aufweisen und sich bereits in anderen Applikationen der Einzelmolekülspektroskopie bewährt haben. Alternative Lösungen finden sich in der Verwendung fluoreszierender Proteine. Hierzu müssen im Vergleich zu GFP photostabilere fluoreszierende Proteine untersucht werden. Hierauf wird im nächsten Kapitel näher eingegangen.

4.5. FLUORESCENZMARKIERUNG MIT MCHERRY

Da sich GFP als zu photoinstabil herausgestellt hat und die Markierung des *SNAP-Tag* auch mithilfe verschiedener Transfektionsreagenzien ohne Erfolg blieb, wurde nach alternativen Markierungsmöglichkeiten gesucht. Entwicklungen im Bereich der fluoreszenten Proteine, vor allem durch Varianten des rotfluoreszierenden Proteins RFP, bieten eine mögliche Alternative, da sich bereits das Monomer von DsRed, mRFP, als photostabiler im Vergleich mit eGFP erwiesen hat [Campbell, 2002]. Zusätzliche Veränderungen der mRFP-Sequenz führten zur Entwicklung der als *mFruits family* bekannten fluoreszenten Proteine. Deren Fluoreszenzemissionsspektrum erstreckt sich vom gelben bis in den dunkelroten Bereich [Shaner, 2004; Wang, 2004]. Von all diesen Proteinen wird mCherry als das Überlegenste erachtet [Shaner, 2005]. Die Untersuchung seiner Eignung für die bildgebende Fluoreszenzmikroskopie wird im Folgenden beschrieben.

4.5.1. Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie mit mCherry

Um etwas über das Fluoreszenzverhalten, vor allem in Bezug auf Photobleichen von mCherry herauszufinden, wurden zunächst Fluoreszenzkorrelationsmessungen am unmodifizierten Protein durchgeführt. Hierzu wurde eine 2 nM Lösung des Proteins in PBS hergestellt und bei verschiedenen Laserintensitäten Intensitätsspektren aufgenommen, um die optimalen Bedingungen für spätere Zellexperimente herauszufinden. Die Anregungsintensität des Lasers wurde hierbei von 25 μW bis 150 μW bei einer Wellenlänge von 561nm variiert. In Abbildung 4.5.1 sind die Korrelationskurven für vier verschiedenen Laserintensitäten gezeigt.

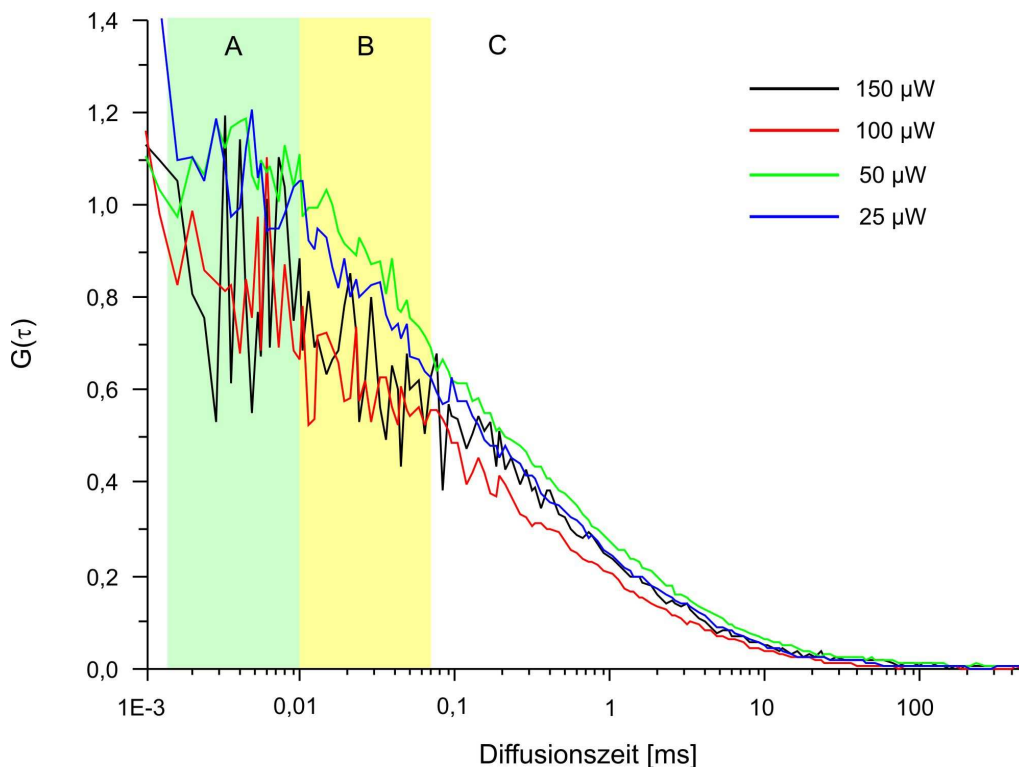


Abbildung 4.5.1: Korrelationskurven einer 2 nM Lösung von mCherry in PBS für verschiedene Anregungsleistungen. Anregung bei 561 nm.

Die Graphen zeigen, dass die Korrelationskurven von mCherry intensitätsabhängig sind. Bei geringen Anregungsintensitäten (A und B) sind die Kurven im Bereich kurzer Zeiten relativ stark verrauscht. Allerdings sind die Wendepunkte der Kurven und damit die Diffusionszeiten gut zu erkennen. Bei höheren Intensitäten tritt zwar weniger Rauschen auf, die mittleren Diffusionszeiten sind allerdings nicht mehr eindeutig durch den Wendepunkt der Kurve abzulesen, da zusätzlich zu den Diffusionstermen Bleichsterme in den Kurven auftreten. Diese sind am Abflachen der Kurven bei längeren Diffusionszeiten zu erkennen. Ebenfalls ist erkennbar, dass die Kurve aus zwei Exponentialtermen besteht. Der zweite Term bei kürzeren Zeiten zwischen Zehn bis 80 Mikrosekunden ist auf Triplettblinken zurückzuführen (B). Blinken bedeutet, dass der Farbstoff schnell zwischen einem fluoreszenten und einem nichtfluoreszenten Zustand wechselt. Dieser Blink-Term nimmt bei steigender Anregungsintensität zu, sodass er die Erkennung der Diffusionskurve durch Überlagerung erschwert. Zusätzlich kommt eine dritte, sehr kurze Komponente zwischen einer und mehreren Mikrosekunden hinzu (A), die einem sogenannten „Flimmer-Term“ (*engl. flickering*) entspricht [Hendrix 2008].

Des Weiteren zeigt sich, dass die Amplitude des Triplett-Terms mit steigender Anregungsintensität zunimmt, d. h. das Protein geht bei höheren Intensitäten zunehmend in nichtfluoreszente Zustände über, die durch Triplettblinken gedeutet

werden können. Bei geringen Intensitäten ist dieser Term durch Rauschen überlagert; bei höheren Anregungsintensitäten wird sie zunehmend glatter. Da für alle Messungen dieselbe Probe verwendet wurde und die Intensität während der Messung nicht abgenommen hat, ist davon auszugehen, dass die Amplitude für die Diffusion annähernd gleich bleibt. Die Abbildungen 4.5.1-A und B zeigen, dass diese einem Wert von etwa 0,65 entspricht, wohingegen bei C und D das Plateau der Kurve nicht festzustellen ist, und nur angenommen werden kann, dass diese konstant bleibt.

Für die Messungen mit mCherry als Fluoreszenzmarker ist es daher wichtig, darauf zu achten, dass die Anregungsleistung adäquat gewählt wird, um die zweite Blinking-Komponente gering zu halten. Wird diese zu groß, ist es rechnerisch schwer bzw. unmöglich, Kurven sinnvoll an die Messwerte anzupassen.

Mit DIFIM ist es möglich, wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben, unterschiedliche Diffusionszeiten zu unterscheiden. Allerdings ist es schwer, absolute Werte zu bestimmen.

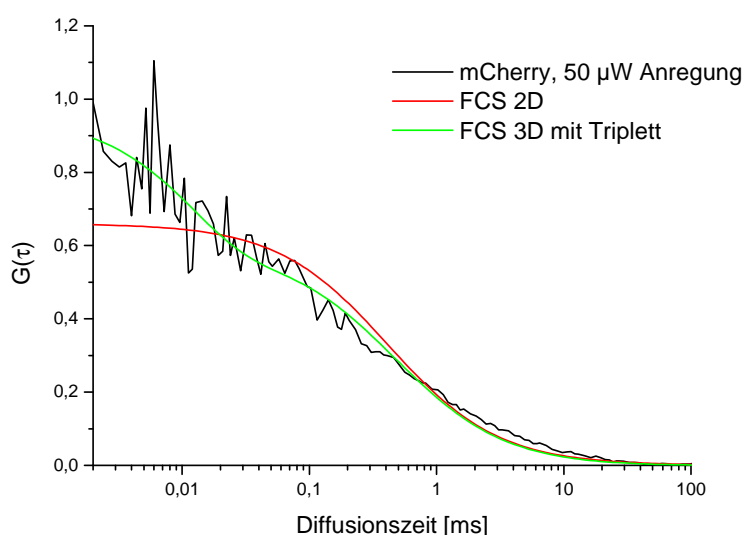


Abbildung 4.5.2: Korrelationskurven einer 2 nM Lösung von mCherry in PBS mit zugehöriger zweidimensionaler (rot) und dreidimensionaler Fitanpassung bei der zusätzlich Triplettblinken berücksichtigt wurde (grün). Anregung 50 μW bei 561 nm. Der Fit für die reine dreidimensionale Diffusion unterscheidet sich nicht wesentlich von dem der zweidimensionalen und ist aus Gründen der Übersichtlichkeit hier nicht dargestellt.

Im Graph ist zu sehen, dass die Anpassung des Fits an die Daten nicht optimal ist. Amplitude und Diffusionszeit werden im zweidimensionalen Fall zwar relativ gut wiedergegeben, aber die Abweichung von den gemessenen Daten (schwarz) ist offensichtlich. Im Falle der dreidimensionalen Anpassung mit zusätzlicher Berücksichtigung des Triplettblinkens entspricht der angepasste Fit den Messwerten besser. Auch hier ist eine Abweichung im Bereich von mehreren Millisekunden zu

erkennen. Der Vergleich der erhaltenen Fitparameter (Tabelle 4.5.1) verdeutlicht, dass sich die berechneten Diffusionszeiten innerhalb der Fehlergrenzen nicht unterscheiden. Somit stellt die Verwendung der dreidimensionalen Funktion mit Tripletberücksichtigung keine Verbesserung dar, da die, durch DIFIM gewonnenen Daten ungenauer sind, als die durch Standard-FCS gewonnenen Daten. Dies liegt vor allem an den kürzeren Integrationszeiten, die für die bildgebende Diffusionsmikroskopie angewendet werden.

Im Folgenden macht es für die Messungen wenig Unterschied, ob zwei- oder dreidimensionale Fitfunktionen angepasst werden. Deshalb wurde weiterhin ein zweidimensionales Diffusionsmodell verwendet, da der Rechenaufwand mit diesen deutlich verkürzt werden kann.

	2 D	3D Triplet
Formel	$y = \frac{A}{1 + \frac{x}{t_d}}$	$y = \frac{A \cdot \left(1 - A_{\text{Tripl}} + A_{\text{Tripl}} \cdot e^{\left(-\frac{x}{t_{\text{Tripl}}} \right)} \right)}{1 + \frac{x}{t_d}} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{x}{t_d} \cdot \frac{1}{k^2}}}$
Amplitude	0,660 ± 0,013	0,954 ± 0,027
Diffusionszeit	0,412 ± 0,042	0,472 ± 0,047
Strukturparameter		8 (fest)
Triplet-Amplitude		0,383 ± 0,022
Tripletzeit		0,012 ± 0,002

Tabelle 4.5.1: Werte und Formeln der an die Daten angepassten Modellfunktionen.

4.5.2. Bildgebende Diffusionsmikroskopie mit mCherry in lebenden Zellen

Da die natürliche Auswahl fluoreszierender Proteine im roten Bereich gering ist und synthetische Farbstoffe bislang nicht zur spezifischen Markierung eingesetzt werden konnten, ist es primär wichtig herauszufinden, ob DIFIM-Messungen mit mCherry überhaupt sinnvoll sein können, oder ob dieses Protein generell auszuschließen ist.

In Anlehnung an die vorangegangenen Experimente (Kapitel 1.5.1) wurden die DIFIM-Messungen bei einer Leistung von 75 µW durchgeführt, um das Blinken von mCherry

möglichst gering zu halten aber dennoch genügend Photonen für die Auswertung der Korrelationsfunktionen zu detektieren.

Als Probe wurden Mäusefibroblasten (NIH 3T3) eingesetzt die mit einem STAT5b-mCherry-Fusionsprotein transfiziert wurden. Dieses wurde mithilfe von 20 ng Doxycyclin pro μl Medium zur Expression angeregt. Mithilfe einer EMCCD-Kamera wurde die Fluoreszenz der Zellen überprüft. In Abbildung 4.5.1 sind die Durchlicht- und Fluoreszenzbilder zweier transfizierter Zellen gezeigt:

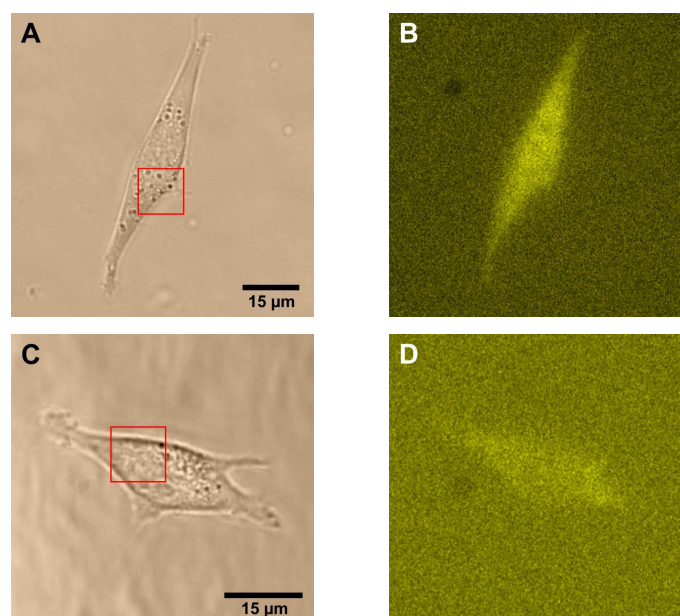


Abbildung 4.5.2: Durchlicht- (A, C) und Fluoreszenzbild (B, D) von STAT5b-mCherry transfizierten Zellen. Das rote Quadrat kennzeichnet den Bereich der für DIFIM herangezogen wurde.

In Abbildung 4.5.2 B und D sind typische Fluoreszenzverteilungen gezeigt. In beiden Fällen ist die Fluoreszenz homogen verteilt, d. h. STAT5b ist sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma anzutreffen. In Abbildung 4.5.2-D ist eine etwas geringere Intensität im Zellkern erkennbar, die vermutlich auf ein geringeres Expressionslevel des STAT5-Proteins zurückzuführen ist. In Abbildung 4.5.3 sind die zugehörigen Intensitäts- und Diffusionsbilder gezeigt.

Der Zellkern (N) in Abbildung 4.5.3-A weist ein stärkeres Fluoreszenzsignal als das umgebende Zytoplasma (Z) auf. Das Diffusionsbild (4.5.3-B) zeigt, dass die Diffusion im Zellkern langsamer ist als im umgebenden Zytoplasma. Dies ist dadurch zu erklären, dass STAT5b im Zellkern als Dimer die Transkription aktiviert. Daher sollte das Dimer, nach Wechselwirkung mit anderen, für die Transkription notwendigen Proteinen, aufgrund der größeren Masse eine langsamere Diffusionszeit aufweisen als das

Monomer, welches sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern anzutreffen ist. Die Diffusionszeit im umgebenden Medium (M) ist wiederum kürzer als die im Zytoplasma, was den Erwartungen entspricht, da sich die markierten Proteine nahezu ungehindert im Medium bewegen können. Im Zytoplasma liegt eine größere Viskosität vor, die entsprechend eine längere Diffusionszeit bewirkt.

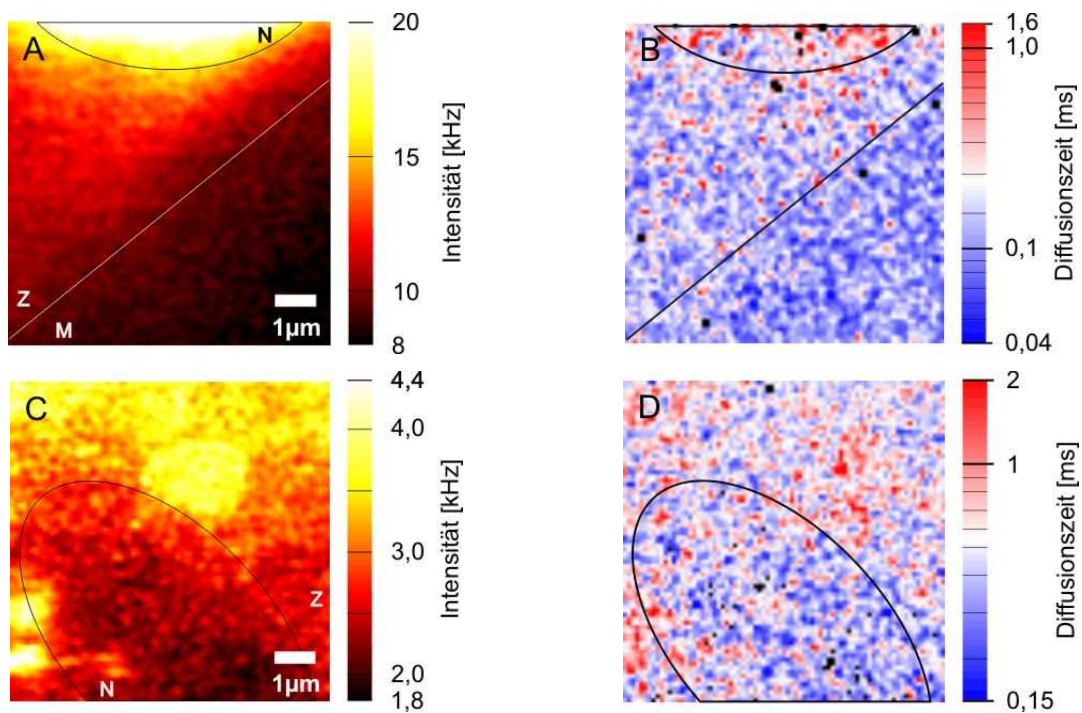


Abbildung 4.5.3: Intensitäts- (A, C) und Diffusionsbilder (nach Autokorrelation) (B, D) von STAT5b-mCherry transfizierten Zellen. Bildausschnitt $12 \times 12 \mu\text{m}^2$, Integrationszeit 100 ms/Pixel, Anregungsintensität $75 \mu\text{W}$. N: Nukleus, Z: Zytoplasma, M: Medium.

Abbildung 4.5.3-C zeigt einen anderen Sachverhalt. Hier ist der Zellkern (N) aufgrund seiner schwächeren Fluoreszenz zu erkennen. Verglichen mit dem Intensitätsbild A ist die Intensität wesentlich geringer. Die Diffusion im Zellkern ist hier schneller als im Zytoplasma (Z). Dies zeigt wiederum, dass sich die Zellen unterschiedlich verhalten, eventuell in Abhängigkeit vom Stadium im Zellzyklus. Deshalb ist es von besonderem Interesse nicht nur Informationen über eine Population mehrerer Zellen zusammen zu erhalten, sondern durch Beobachtung mehrerer einzelner Zellen, Informationen aus den unterschiedlichen Subpopulationen zu erhalten.

Um Informationen darüber zu bekommen, wie stark die gemessenen Diffusionszeiten von den absoluten abweichen, wurden zusätzlich zu den bildgebenden Diffusionsaufnahmen an anderen Stellen innerhalb des Zytoplasmas Fluoreszenzintensitätsspuren mithilfe der Korrelatorkarte ALV aufgenommen. In

Abbildung 4.5.4 ist exemplarisch ein Graph für die in Abbildung 4.5.3 A gezeigte Zelle dargestellt.

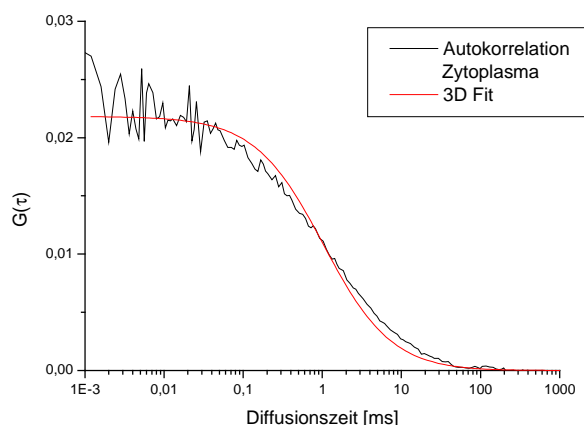


Abbildung 4.5.4: Autokorrelation und Modellanpassung der in Abbildung 4.5.3 A gezeigten Zelle.

Die Korrelationskurve zeigt, dass die Photozerstörung von mCherry gering ausfällt und die Kurve durch eine dreidimensionale Modellanpassung dargestellt werden kann. Die durch die Anpassung bestimmte Diffusionszeit von 1,03 ms stimmt in grober Näherung mit denen durch die Bildgebende Diffusionsmikroskopie bestimmten Werten zwischen 0,8 und 2 ms überein (Abbildung 4.5.3). Die Anpassung einer zweidimensionalen Diffusionsfunktion ergibt eine Diffusionszeit von 0,99 ms. Dieser Wert weicht nur geringfügig von dem durch ein dreidimensionales Fitmodell bestimmten Wert ab (1,03 ms). Dieses Experiment zeigt, dass die Annahme eines zweidimensionalen Diffusionsmodells für die Bildgebende Diffusionsmikroskopie zur Vereinfachung der Auswerterroutine gangbar ist und sinnvolle Diffusionszeiten berechnet und dargestellt werden können.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass DIFIM das Potential hat, um unterschiedliche Diffusionszeiten in Echtzeit und über größere Bereiche sichtbar zu machen, ohne dabei Kompromisse in der Auflösung eingehen zu müssen. Es zeigte sich, dass synthetische Farbstoffe, die eine hohe Photostabilität aufweisen und sich bereits in der Einzelmolekülspektroskopie als gute Fluoreszenzmarker erwiesen haben, sich noch nicht als spezifische Zellenmarker eignen. Trotz Verwendung verschiedener Transport- und Markierungssysteme, wie z. B. den des *SNAP-Tag*, blieb es bisher unmöglich synthetische Farbstoffe im roten Spektralbereich spezifisch an Zellrezeptoren zu binden. Durch Verwendung des fluoreszierenden Proteins mCherry wurde ein potentieller, wenn auch mit Kompromissen zu verwendender Marker gefunden, der es ermöglicht, verschiedene Diffusionszeiten innerhalb von Zellen sichtbar zu machen.

Damit ist eine gute Voraussetzung für weitere Experimente geschaffen, um Informationen über den JAK-STAT-Signalweg, insbesondere über die Änderung der Diffusionszeit durch Phosphorylierung und Dimerisierung der STAT-Proteine, zu erforschen.

5. DISKUSSION UND AUSBLICK

In dieser Arbeit wurde die neuentwickelte Einzelmolekülmethode der Bildgebenden Diffusionsmikroskopie (DIFIM) dahingehend untersucht, Diffusionsprozesse in zellulärer Umgebung zu messen, um anschließend biologische Fragestellungen, wie z. B. die Verfolgung von Signaltransduktionswegen zu beobachten.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde DIFIM erfolgreich an einem Testsystem erprobt. So konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, unterschiedliche Diffusionszeiten innerhalb einer Zelle darzustellen. Aufgrund der geringen Photostabilität des Grün-Fluoreszierenden Proteins (GFP) konnten Untersuchungen am JAK-STAT Signalweg zunächst nicht durchgeführt werden.

Der zweite Teil dieser Arbeit behandelt deshalb die spezifische Markierung von Proteinen mit photostabilen, synthetischen Farbstoffen, die sich bereits in Einzelmoleküluntersuchungen bewährt haben. In der Durchführung wurde das kommerziell erhältliche *SNAP-Tag*-System verwendet.

5.1. BILDGEBENDE DIFFUSIONSMIKROSKOPIE (DIFIM)

Die Methode der Bildgebenden Diffusionsmikroskopie (DIFIM) vereint die orts- und zeitaufgelöste Einzelmolekülspektroskopie (SFLIM) mit der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) [Roth 2006]. Dies ermöglicht die Untersuchung von Diffusionszeiten sowohl mit hochpräziser örtlicher Auflösung, als auch gleichzeitig, durch zusätzliche Verwendung von Informationen aus Fluoreszenzlebensdauern, die genaue Diskriminierung von Farbstoffen gegen zelleigene Autofluoreszenz. So können erstmals Diffusionskarten von Zellen erstellt werden, die schnelle Diffusionsprozesse, d. h. Prozesse unter einer Zeitskala von einigen Millisekunden ablaufen, berücksichtigen. Die Probe wird hierzu mittels eines Piezotisches pixelweise abgefahren (Rasterscanning). Der Laser verweilt für mehrere Millisekunden (25 – 200 ms) auf einem Pixel und ermöglicht in dieser Zeit die Detektion von Fluoreszenzfluktuationen an dieser Stelle. Aus diesen Intensitätsinformationen wird nach der Datenaufnahme über eine Auto- oder Kreuzkorrelation die Diffusionszeit für den gemessenen Bildpunkt bestimmt.

Ein Teil dieser Arbeit widmet sich der Untersuchung bzw. Erprobung von DIFIM in zellulärer Umgebung. Mithilfe eines Testsystems für lebende Zellen konnten unterschiedliche Diffusionszeiten farbstoffmarkierter Oligonukleotide sichtbar gemacht werden, wobei die Fluoreszenzsignale eindeutig dem Farbstoff zugeordnet und eine Verwechslung mit Autofluoreszenz ausgeschlossen werden konnte.

Bei der Inkubation der Zellen entstanden heterogene Intensitätsverteilungen (Abbildung 5.1.1). So wurden, trotz gleicher Zelllinie und gleichbleibenden Markierungsprotokollen, einerseits Zellen mit einer geringen (A), andererseits Zellen mit einer hohen Fluoreszenzintensität im Zellkern (B) erhalten.

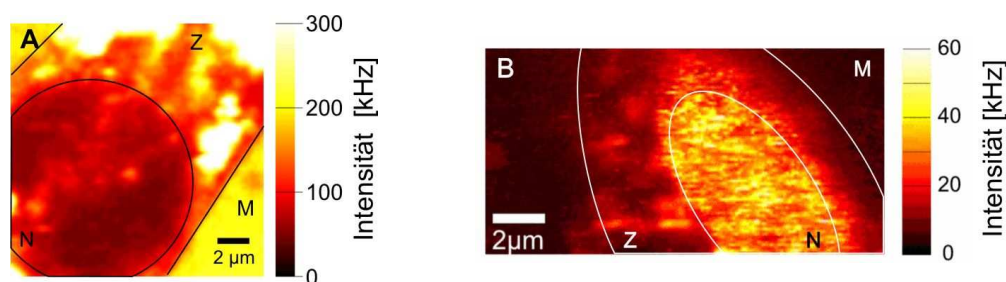


Abbildung 5.1.1: Fluoreszenzintensitätsbilder von mit dT_{20} -Atto 488 ($c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) inkubierten 3T3-Fibroblasten (A) $16 \times 16 \mu\text{m}^2$, 100 nm / Pixel Auflösung, 100 ms / Pixel Integrationszeit, (B) $5 \times 10 \mu\text{m}^2$, 100 nm / Pixel Auflösung, 100 ms / Pixel Integrationszeit Z: Zytoplasma; N: Nukleus, M: Medium.

Beides erscheint logisch. Da sich die mRNA, d. h. das Zielmolekül des farbstoffmarkierten Oligonukleotids (T_{20} -Atto 488) zu 90 % im Zellkern aufhält, ist eine Anhäufung des Farbstoffes im Zellkern durch Hybridisierung an den PolyA-Strang der mRNA wahrscheinlich. Andererseits muss das Oligonukleotid auf seinem Weg in den Zellkern zwei Membranen überwinden und kann im Zytoplasma mit Kompartimenten, wie z. B. dem Endoplasmatischen Retikulum wechselwirken. Dies kann die gefundenen geringen Fluoreszenzintensitäten im Zellkern erklären. Vermutlich hängt die unterschiedlich effiziente Aufnahme des Oligonukleotids vom jeweiligen Stadium des Zellzyklus ab, in dem sich eine Zelle gerade befindet.

Die Viskositäten innerhalb und außerhalb der Zellen sind unterschiedlich groß. In den Messungen wurden unterschiedliche Diffusionswerte im Zellkern und im Zytoplasma erhalten, die durch die Möglichkeit der Hybridisierung des Oligonukleotids an den PolyA-Strang der zelleigenen mRNA erklärt werden kann. Zusätzlich zu den an die mRNA gebundenen Oligonukleotiden findet sich auch freies, ungebundenes Substrat in der Zelle, welches durch Waschschrte nicht vollständig entfernbar ist.

Es konnte gezeigt werden, dass DIFIM nicht nur in lebenden Zellen angewendet werden kann, sondern auch eine geeignete Methode ist, um unterschiedliche Diffusionszeiten *in*

in vivo darzustellen. So konnten Diffusionsgeschwindigkeiten von farbstoffmarkierten Sonden im Zytoplasma gegen die freie Lösung und sogar gegenüber anderen Zellteilen abgegrenzt werden. Gleichzeitig ist die Fluoreszenz aufgrund der Fluoreszenzlebensdauermessungen eindeutig dem Farbstoff zuzuordnen und die Unsicherheit der Detektion autofluoreszenter Strukturen entfällt. Damit erscheint die Untersuchung von Signalproteinen, wie z. B. STAT5 [Swameye 2003] oder Mitgliedern der Smad-Proteinfamilie [Inman 2002] vor und nach deren Rezeptoraktivierung vielversprechend. Hier sollte es möglich sein, Unterschiede beim Transportzyklus des Proteins zwischen Zytoplasma und Zellkern verfolgen zu können. Diese Rezeptoraktivierung findet auf einer Zeitskala von etwa 30 min bis zu mehreren Stunden statt, sodass die zugrundeliegenden Diffusionen mit DIFIM untersucht werden konnten.

Als biologisch relevantes System für einen Signalprozess wurde der JAK-STAT Signalweg genauer untersucht [Schindler 1995; Ihle 1996]. Das Protein STAT5b wurde hierzu mit dem Grün-Fluoreszierenden Protein markiert, in Zellen transduziert und zur Expression stimuliert. Für die Messung von Diffusionszeiten, bzw. für die Erzeugung aussagekräftiger Korrelationsfunktionen, sind hohe Laserintensitäten von mindestens 50 μW notwendig. Die DIFIM-Messungen des GFP-markierten Proteins mit derartigen Anregungsintensitäten offenbarten eine geringe Photostabilität des fluoreszierenden Proteins. Dieses bleichte während der Messung, sodass durch die, für Standard-Fluoreszenz-Korrelationsuntersuchungen geringen Anregungsintensitäten und kurzen Integrationszeiten, keine aussagekräftigen Korrelationskurven erhalten wurden. Starkes Photobleichen führt zu kürzeren Diffusionszeiten [Widengren 1996, Eggeling 1998]. Folglich werden zu Beginn der Messung andere Diffusionszeiten erhalten als am Ende und die Wiedergabe der Heterogenitäten entspricht nicht den realen Gegebenheiten. Um die bildgebende Diffusionsmikroskopie in lebenden Zellen zu etablieren, musste deshalb eine Möglichkeit gefunden werden, GFP durch photostabile Farbstoffe zu ersetzen und diese spezifisch an das zu untersuchende Protein zu binden.

Für DIFIM-Messungen in lebenden Zellen ist es sinnvoll, die Aufnahmezeit gering zu halten. Durch das Objektscanningverfahren können, je nach Größe der aufgenommenen Bilder, Auflösung und Integrationszeit, sehr lange Messzeiten resultieren. Untersuchungen mit einer Farbstofflösung konstanter Konzentration haben gezeigt, dass veränderte Integrationszeiten zu Diffusionszeitänderungen führen (Abbildung 5.1.2).

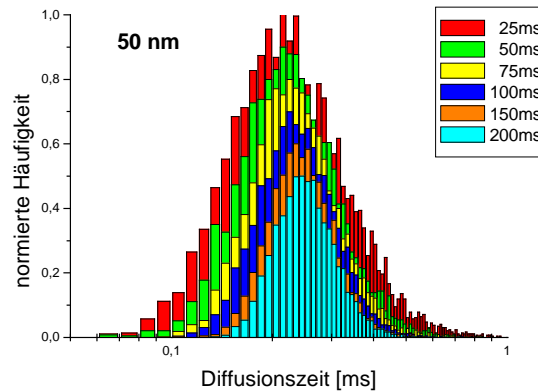


Abbildung 5.1.2: Häufigkeitsverteilung der Diffusionszeiten für verschiedene Integrationszeiten (25 – 200 ms). Auflösung: 50 nm / Pixel. Die einzelnen Histogramme sind, um eine bessere Übersicht zu erhalten, auf unterschiedliche Maxima normiert.

Für längere Integrationszeiten werden längere Diffusionszeiten berechnet. Die Verschiebung liegt im Rahmen der auftretenden Schwankungsbreite der Diffusionszeiten. Diese liegt für kurze Integrationszeiten im Bereich mehrerer Zehntel Millisekunden. So werden bei den DIFIM-Messungen mit unterschiedlichen Integrationszeiten zwar unterschiedliche Diffusionszeiten erhalten, die gewonnenen Daten unterliegen jedoch einem stärkeren Rauschen und die Fluktuationen der Diffusionszeit sind größer als die Verschiebung, die durch die unterschiedlichen Integrationszeiten zustande kommen. Durch Variation der Auflösung konnte keine Veränderung der Diffusionszeit festgestellt werden.

5.2. FLUORESCENZMARKIERUNG MITHILFE DES *SNAP-TAGS*

Um in der Fluoreszenzkorrelations-Spektroskopie aussagekräftige Korrelationsfunktionen zu erhalten, ist es von Bedeutung, möglichst viele Intensitätsfluktuationen zu detektieren. Mit steigender Verweildauer der Farbstoffmoleküle im Laserfokus erhöht sich die Wahrscheinlichkeit für Photobleichen. Bei hohen Laserintensitäten ist es folglich schwerer, Aussagen über die Diffusionseigenschaften von Proteinen zu treffen. Die in der Biologie häufig verwendeten fluoreszenten Proteine, wie GFP, YFP oder RFP, besitzen im Vergleich zu synthetischen Farbstoffen ungünstige photophysikalische Eigenschaften. Hierzu gehören vor allem die geringe Photostabilität und das damit verbundene schnelle Photobleichen. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die schonende Markierung von Proteinen mit synthetischen Farbstoffen untersucht.

Als Markierungssystem wurde der kommerziell erhältliche *SNAP-Tag* verwendet [Keppler 2004]. Dieser nutzt den Reparaturmechanismus des humanen DNA-Reparaturproteins O⁶-Benzylguanin-DNA-Alkyltransferase (hAGT). Das modifizierte Enzym erkennt *para*-substituiertes Benzylguanin und überträgt eine Benzylgruppe irreversibel auf ein Cystein des hAGT. So ist es möglich, synthetische organische Farbstoffe, die mit Benzylguanin modifiziert wurden, kovalent an das zu untersuchende Protein zu binden.

In dieser Arbeit wurden verschiedene organische Farbstoffe, die im roten Spektralbereich fluoreszieren, auf ihre Eignung getestet, den *SNAP-Tag in vivo* in adhärenen Säugerzellen zu markieren. In *E. coli*-Bakterien konnte der *SNAP-Tag* mit diesen Farbstoffen bereits erfolgreich markiert werden [Stöhr 2008]. Für die Untersuchungen wurden fünf Farbstoffe aus verschiedenen Farbstoffklassen ausgewählt, die sich durch eine hohe Photostabilität auszeichnen.

Farbstoff	Absorption λ_{ex} [nm]	Emission λ_{em} [nm]	Derivat	Extinktionskoeffizient ϵ [$\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$]
Atto 620	619	643	Carbopyronin	120 000
Atto 633	629	657	Carbopyronin	120 000
CY 5	646	664	Cyanin	250 000
Atto 647N	644	669	Carborhodamin	150 000
MR 121	660	675	Oxazin	125 000

Tabelle 5.2.1: Spektrale Daten der verwendeten Farbstoffe. Die entsprechenden Strukturen sind, soweit veröffentlicht, in Kapitel 7.2 dargestellt.

Ein Vorteil der Verwendung des *SNAP-Tags* besteht in der Möglichkeit, Fluoreszenzfarbstoffe zu verwenden, die durch Guanin in ihrer Fluoreszenzemission beeinflusst werden (z. B. MR 121) [Heinlein 2004; Stör 2008]. Solange der Farbstoff an Benzylguanin gebunden ist, ist dieser gering fluoreszierend. Sobald die spezifische Bindung an den *SNAP-Tag* erfolgt und Guanin als Abgangsgruppe entfernt wird, steigt die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes. Hierdurch wird es möglich, unspezifisches Hinttergrundsignal zu reduzieren und aufwendige Waschschrte, die nach Inkubation mit derartigen Farbstoffen normalerweise notwendig sind, entfallen.

Als Testsystem wurden zwei verschiedene Zelllinien verwendet. Einerseits wurden NIH 3T3-Zellen eingesetzt, die mit dem an den Kaliumkanal Kcv fusionierten *SNAP-Tag* transfiziert wurden. Andererseits dienten CHO-H2B-Zellen, die stabil mit einem Fusionsprotein des *SNAP-Tags* und dem Histon 2B transfiziert wurden, als Testsystem.

Es zeigte sich, dass die verwendeten und an Benzylguanin gekoppelten Farbstoffe nicht in der Lage waren, den *SNAP-Tag* in der Zelle spezifisch anzufärben. Sowohl in den Fibroblasten, als auch in den Hamsterovarien, konnte nur Fluoreszenz im Zytoplasma detektiert werden. Die erwartete charakteristische Färbung der Kernmembran im Falle des Kcv, wie auch die Anfärbung des Histons im Zellkern, blieb aus.

Die Vermutung, dass das Substrat für die Diffusion durch die Zellmembran zu groß ist, wurde durch Modifizierung des Systems mit einem anderen, ebenfalls mit dem *SNAP-Tag* reagierenden, Transporter untersucht. Dieses 4-(4-(Aminomethyl)benzyloxy)-6-chloropyrimidin-2-amin (CP) ist nicht kommerziell erhältlich. Es wurde mit einem Tetramethylrhodaminderivat (TAMRA) als Farbstoff erfolgreich getestet, bei dem BG nicht in der Lage war, dieses in die Zelle zu schleusen [Stöhr 2008]. Ein Nachteil dieses Substrates ist, dass es nicht wie BG in der Lage ist, Farbstoffe wie z. B. MR 121 in ihrer Fluoreszenzemission zu beeinflussen. In der Folge konnte die Reduzierung der Hintergrundfluoreszenz durch das Löschmolekül Guanin nicht ausgenutzt werden und zusätzliche Waschschriffe zur Reduktion unspezifischen Fluoreszenzsignals wurden notwendig.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass mit Verwendung von CP als Transporter eine spezifische Färbung des *SNAP-Tags*, nicht möglich ist. Die Fluoreszenzmarkierung bleibt auf das Zytoplasma beschränkt.

In den Bildern (als Beispiel ist die Markierung von Hamsterovarien mit BG- bzw. CP-Atto 647N gezeigt, Abbildung 5.2.1) ist zu erkennen, dass die Fluoreszenz nicht homogen im Zytoplasma, sondern punktuell verteilt ist.

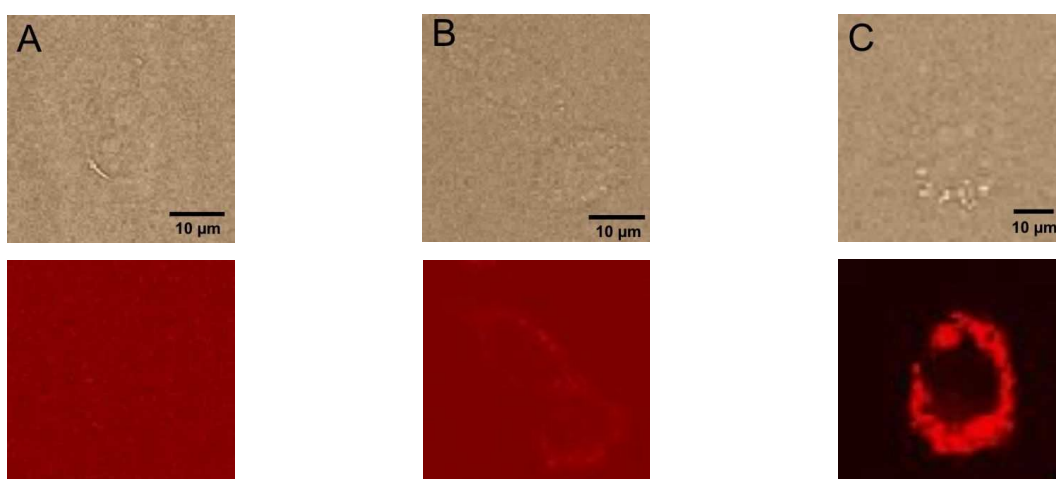


Abbildung 5.2.1: Durchlicht- und Fluoreszenzbilder der mit dem Histon 2B transfizierten Hamsterovarien (CHO-H2B) (A) Blindprobe, (B) BG-Atto 647N, (C) CP-Atto 647N.

Dies deutet darauf hin, dass der Farbstoff nicht alleine über Diffusion durch die Membran in das Innere der Zelle gelangte. Die Tatsache, dass die Fluoreszenz punktförmig angeordnet ist, lässt vermuten, dass der Farbstoff im Zytoplasma in Vesikel eingeschlossen ist. Eine Begründung hierfür könnte das Einschleusen des Substrates über Endozytose und die Verpackung in Endosomen bzw. Endolysosomen sein. Das würde bedeuten, dass sowohl das BG-, wie auch das CP-Substrat nicht in der Lage sind, die Membran zu überwinden und folglich auch nicht aus den Endosomen, die ebenfalls von einer Membran umschlossen sind, in die Zelle gelangen. Um zu untersuchen, ob die Substrate über Endozytose in die Zelle gelangen, wurde die Färbung zusätzlich mit einem Endozytosemarker (FM 4-64) durchgeführt (Abbildung 5.2.2).

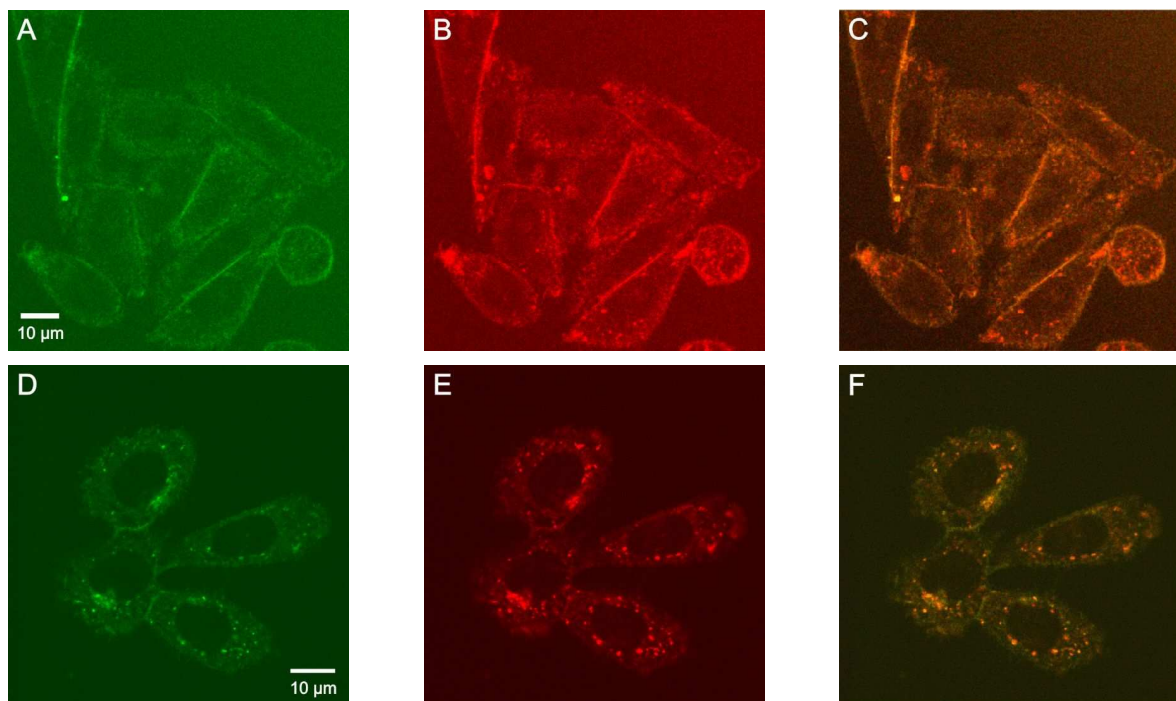


Abbildung 5.2.2: Fluoreszenzbilder der mit dem Histon 2B transfizierten Hamsteroovarien (CHO-H2B) (A) FM 4-64 (30 min Inkubation), (B) BG-MR 121 (2 h Ink.), (C) Überlagerung beider Aufnahmen A + B (D) FM 4-64 (2 h Ink.), (E) BG-MR 121 (2 h Ink.), (F) Überlagerung beider Aufnahmen E + F.

Der Vergleich der beiden Experimente legte nahe, dass die punktförmige Anordnung vermutlich durch Anreicherung des Farbstoff-Substrates in Endosomen und Lysosomen zustande kommt. Nach 30 Minuten Inkubation wurde noch eine homogene Verteilung bzw. eine Anfärbung der Zellmembran, mit dem Endozytosemarker FM 4-64 erhalten. Nach zweistündiger Inkubation trat auch hier eine punktförmige Verteilung auf, welche dafür spricht, dass die BG- bzw. CP-Substrate über Endozytose in die Zellen gelangen und dort Vesikeln eingeschlossen sind. Um dies zu verhindern, müsste die Endozytose

effektiv gehemmt werden. Diese könnte durch Abkühlen der Zellen während der Inkubation gestoppt werden, was allerdings die lange Inkubationszeit von über zwei Stunden verhindert. Eine andere Möglichkeit wäre der Zusatz von Endozytosehemmern, die jedoch die natürlichen Bedingungen der Zelle beeinflussen würden. Zum Verständnis müssten weitere Experimente durchgeführt werden, um herauszufinden, inwieweit Endozytosehemmer unter *in vivo*-Bedingungen die zelluläre Umgebung und damit die Diffusionszeiten beeinträchtigen.

5.2.1. Fluoreszenzmarkierung mithilfe von Transfektionsreagenzien

Da es nicht möglich war, den *SNAP-Tag* im Zellkern durch Inkubation der Substrate spezifisch anzufärben, wurde nach alternativen Möglichkeiten gesucht, deren Aufnahme zu erleichtern. Hier wurden zwei verschiedene Reagenzien getestet: Lipofectamine 2000 basiert auf der Bildung von Liposomen, die in der Lage sein sollten, die Substrate einzuschließen und diese durch Fusion mit der Zellmembran, in das Innere der Zelle zu schleusen. Das zweite Reagenz, Streptolysin O, nutzt sein Potential, Löcher in Membranen zu reißen und Kanäle durch die Membran zu formen. Hierdurch sollte es geschafft werden, Substrate in das Zytoplasma der Zelle zu schleusen.

Im Falle des Lipofectamine 2000 konnte kein Unterschied in der Anfärbung im Vergleich zur ursprünglichen Inkubation festgestellt werden. Möglicherweise könnte es sein, dass Lipofectamine 2000, ein kationisches Reagenz, nicht in der Lage ist, mit den größtenteils kationischen, und damit sich gegenseitig abstoßenden Farbstoffen zu wechselwirken. Dagegen spricht, dass die Anfärbung mit einem negativ geladenen Farbstoff (CY 5) die schlechtesten Ergebnisse im Vergleich zu positiv geladenen Farbstoffen erzielte. Offensichtlich existieren bei der Transfektion mit Lipofectamine 2000 weitere Effekte, die die Aufnahme der BG- bzw. CP-Substrate begünstigen. Die Farbstoffe könnten beispielsweise direkt mit der Membran wechselwirken und auf diese Weise, d. h. über zelleigene Prozesse, wie den aktiven bzw. passiven Transport, oder die erleichterte Diffusion, in das Zytoplasma gelangen. Zusätzlich wurde auch mit Lipofectamine 2000 die punktförmige Verteilung der Fluoreszenz erhalten. Dies könnte darauf hindeuten, dass hier ein ähnlicher Aufnahmemechanismus zugrunde liegt wie bei den Inkubationsexperimenten.

Die Verwendung von Streptolysin O führte ebenfalls zu keiner spezifischen Markierung. Auch in diesem Fall blieb die gewünschte Färbung des *SNAP-Tags* im Zellkern aus. Trotz der Bildung von polaren Kanälen, die Streptolysin O durch die Membran zieht, gelingt es

den Substraten nicht, diese als Eingangsportal in die Zelle zu nutzen. Auch hier wurde die schon vorher detektierte punktförmige Verteilung im Zytoplasma erhalten, was auf die Aufnahme über Endozytose und die Verpackung des Farbstoffes in Vesikeln, Liposomen oder ähnlichen zelleigenen Strukturen hindeutet.

Um herauszufinden, welche Zellstrukturen der punktförmigen Anordnung zugrunde liegen, müssen Kolo-kalisationsexperimente mit verschiedenen spezifischen Zellorganellmarkern, wie z. B. LysoTracker für Lysosome, SelectFX Alexa Fluor 488 für Peroxisome, etc. durchgeführt werden. Eine weitere Möglichkeit wäre die Injektion eines Farbstoff-Substrates in den Zellkern. Hierbei sollte darauf geachtet werden, dass nicht zuviel der Probensubstanz injiziert wird, damit störende Hintergrundfluoreszenz durch ungebundenes Substrat gering gehalten wird, da Waschschrirte in diesem Fall schwer oder gar unmöglich sind. Durch Beschaffung eines Injektionssystems für lebende adhären-te Zellen soll dieser Ansatz zeitnah untersucht werden.

Nichtsdestotrotz ist es wichtig, weitere Fluoreszenzmarker zu untersuchen, um Diffusionsprozesse in lebenden Zellen mithilfe der bildgebenden Diffusionsmikroskopie erforschen zu können. Hierzu müssen jedoch erst geeignete Markierungsansätze gefunden und etabliert werden.

5.3. BILDGEBENDE DIFFUSIONSMIKROSKOPIE MIT MCHERRY

Da sich GFP für DIFIM-Experimenten als zu photolabil herausgestellt hat und die Markierung des *SNAP-Tags* mithilfe der Transfektionsreagenzien Lipofectamine 2000 und Strepolysin O nicht spezifisch war, wurde nach alternativen Markierungsmöglichkeiten gesucht. Entwicklungen im Bereich der fluoreszenten Proteine, vor allem durch Varianten des Rot-Fluoreszierenden Proteins (RFP), bieten hier eine mögliche Alternative, da sich das Monomer von DsRed, mRFP, bereits als photostabil im Vergleich zu eGFP erwiesen hat [Campbell, 2002]. Veränderungen in der mRFP-Sequenz führten zur Entwicklung der als *mFruits family* bekannten fluoreszenten Proteine, von denen sich mCherry als das Überlegenste herausgestellt hat.

Es zeigte sich, dass die Korrelation von mCherry stark intensitätsabhängig ist (Abbildung 5.3.1). So treten bei zunehmender Anregungsintensität Bleichterme auf, die den Diffusionsterm überlagern, sodass die mittlere Diffusionszeit häufig nicht mehr genau bestimmt werden kann. Bei geringen Anregungsintensitäten ist dieser Anteil weniger stark ausgeprägt. Zusätzlich zeigen die Daten im Bereich von Mikrosekunden bis zu wenigen Millisekunden deutliches Rauschen.

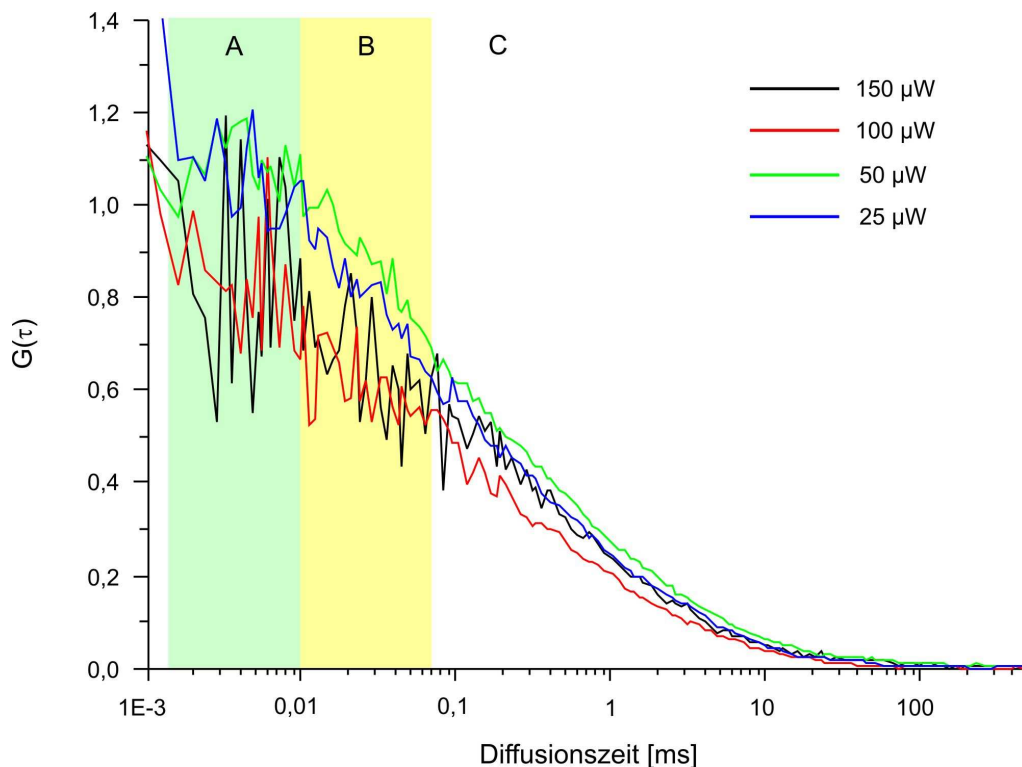


Abbildung 5.3.1: Korrelationskurven einer 2 nM Lösung von mCherry in PBS für verschiedene Anregungsleistungen. 25 μW (schwarz), 50 μW (rot), 100 μW (grün), 150 μW (blau). Anregung bei 561 nm.

Die angepassten zwei- bzw. dreidimensionalen Fitfunktionen gaben die Datenpunkte nur ungenau wieder. Das Modell der dreidimensionalen Diffusion unter Berücksichtigung von Triplettblinken beschreibt den Kurvenverlauf am besten. Die berechneten mittleren Diffusionszeiten lagen im Bereich der Fehlergrenzen, weshalb das Anpassen der komplexeren dreidimensionalen Diffusionsfunktion keinen Vorteil brachte und aus Effizienzgründen weiterhin mit zweidimensionalen Modellen gearbeitet wurde.

Für DIFIM-Messungen in lebenden Zellen wurde das an das STAT5b fusionierte mCherry in lebenden Mäusefibroblasten transduziert und mithilfe von Doxycyclin zur Expression angeregt (Abbildung 5.3.2). Die erhaltenen Diffusionsbilder zeigen, dass es möglich ist, mit mCherry Heterogenitäten innerhalb einer Zelle sichtbar zu machen. So zeigte sich, dass sich bei hohen Expressionsraten die Proteine bevorzugt im Zytoplasma ansammeln und dort Wechselwirkungen mit DNA und anderen, für die Transkription notwendigen Proteinen eingehen. Darauf würde die langsamere Diffusion im Zellkern im Vergleich mit dem Zytoplasma hindeuten. Bei geringeren Expressionsraten wurde eine niedrige Fluoreszenzintensität im Zellkern erhalten. Zusätzlich war die Diffusionszeit in diesen Fällen geringer als im Zytoplasma. Dies kann einerseits darauf zurückgeführt werden, dass die Intensität im Zellkern nicht ausreichend ist, um aussagekräftige

Korrelationskurven zu erhalten. Andererseits könnten durch den höheren Anteil an Proteinen im Zytoplasma Wechselwirkungen mit anderen Zellstrukturen bzw. -kompartimenten auftreten.

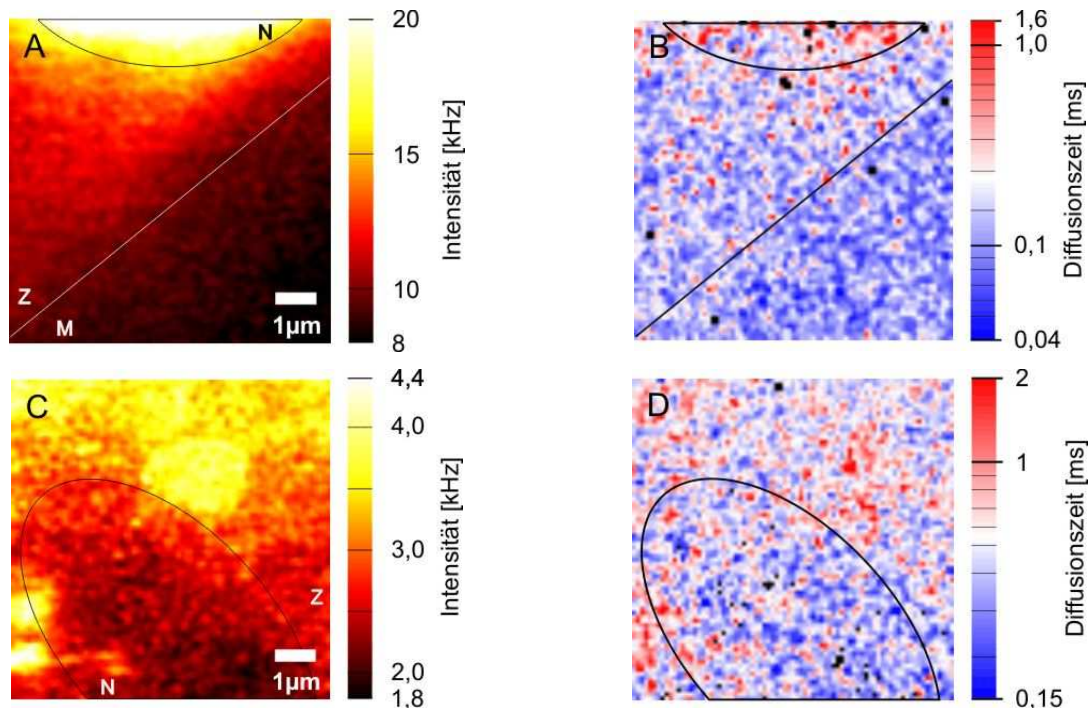


Abbildung 5.3.2: Intensitäts- (A, C) und Diffusionsbilder (nach Autokorrelation) (B, D) von STAT5b-mCherry transfizierten Zellen. Bildausschnitt $12 \times 12 \mu\text{m}^2$, Integrationszeit 100 ms/Pixel, Anregungsintensität $75 \mu\text{W}$. N: Nukleus, Z: Zytoplasma, M: Medium.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die durch DIFIM-Messungen erhaltenen Diffusionswerte nur wenig von den, durch herkömmliche FCS-Messungen, erhaltenen Werten abweichen. Die mit FCS-Messungen erhaltene Diffusionszeit von etwa 1 ms liegt im Bereich der durch DIFIM bestimmten Werte zwischen 0,8 und 2 ms. Das bedeutet, dass DIFIM nicht nur geeignet ist, Heterogenitäten der Diffusionszeiten darzustellen, sondern auch relativ genaue Werte liefert. So konnten erstmals schnelle Diffusionen über einen größeren Bereich einer lebenden Zelle dargestellt werden, während bisherige Messungen auf Diffusionszeiten von mehreren Millisekunden beschränkt waren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass DIFIM das Potential besitzt, um unterschiedliche Diffusionszeiten in Echtzeit und über größere Bereiche sichtbar zu machen, ohne dabei die Auflösung reduzieren zu müssen. Durch Verwendung des fluoreszierenden Proteins mCherry wurde ein potentieller, wenn auch mit Kompromissen zu verwendender Marker gefunden, der es ermöglicht, verschiedene Diffusionszeiten innerhalb von Zellen sichtbar zu machen. Damit, und durch den Erwerb eines neuen Lasers für die Anregung von mCherry, sind gute Voraussetzungen für weitere

Experimente geschaffen, um Informationen über den JAK-STAT-Signalweg, insbesondere über die Änderung der Diffusionszeit durch Wechselwirkung der STAT-Proteine mit DNA und anderen Proteinen, zu erforschen.

6. LITERATUR

Adams, S.R.; Campbell, R.E.; Gross, L.A.; Martin, B.R.; Walkup, G.K.; Yao, Y.; Llopia, J.; Tsien, R.Y.: New biarsenical Ligands and tetracysteine motifs for protein labeling in vitro and in vivo: Synthesis and biological applications. In: J. Am. Chem. Soc. **2002**, 124 (21), 6063-6076.

Alberti, S.; Parks, D.R.; Herzenberg, L.A.: *A Single Laser Method for Substraction of Cell Autofluorescence in Flow Cytometry*. In: Cytometry **1987**, 8 (2), 114-119.

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P.: *Molecular Biology of The Cell*, Garland Science, New York ⁴**2002**.

Atkins, P.W.; Höpfner, A. (Hrsg.): *Physikalische Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim ²**1996**.

Baird, G.S.; Zacharias, D.A.; Tsien, R.Y.: *Biochemistry, mutagenesis, and oligomerisation of DsRed, a red fluorescent protein from coral*. In: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **2000**, 97 (22), 11984-11989.

Barber, D.L.; D'Andrea, A.D.: *Erythropoietin and Interleukin-2 Activate Distinct JAK Kinase Family Members*. In: Molecular and Cellular Biology **1994**, 14 (10), 6506-6514.

Balss, J.; Papatheodorou, P.; Mehmel, M.; Baumeister, D.; Hertel, B.; Delaroque, N.; Chatelain, F.C.; Minor Jr., D.L.; Van Etten, J.L.; Rassow, J.; Moroni, A.; Thiel, G.: *Transmembrane domain length of viral K⁺ channels is a signal for mitochondria targeting*. In: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **2008**, 105 (34), 12313-12318.

Benz, R.; Beckers, F.; Zimmermann, U.: Reversible electrical breakdown of lipid bilayer membranes: a charge-pulse relaxation study. In: J. Membr. Biol. **1979**, 48, 181-204.

Betzig, E.; Patterson, G.H.; Sougrat, R.; Lindwasser, O.W.; Olenych, S.; Bonifacino, J.S.; Davidson, M.W.; Lippincott-Schwartz, J.; Hess, H.F.: *Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution*. In: Science **2006**, 313, 1642-1645.

Bhakdi, S.; Trantum-Jensen, J.; Sziegoleit, A.: *Mechanism of Membrane Damage by Streptolysin-O*. In: *Infect. Immun.* **1985**, *47*, 52-60.

Börsch, M.; Turina, P.; Eggeling, C.; Fries, J.R.; Seidel, C.A.M.; Labahn, A.; Gräber, P.: *Conformational changes of the H⁺-ATPase from Escherichia coli upon nucleotide binding detected by single molecule fluorescence*. In: *FEBS Lett.* **1998**, *437* (3), 251-254.

Campbell, R.E.; Tour, O.; Palmer, A.E.; Steinbach, P.A.; Baird, G.S.; Zacharias, D.A.; Tsien, R.Y.: *A monomeric red fluorescent protein*. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99* (12), 7877-7882.

Chalfie, M.; Tu, Y.; Euskirchen, G.; Ward, W.W.; Prasher, D.C.: *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*. In: *Science* **1994**, *263*, 802-805.

O'Connor, D.V.; Phillips, D.: *Time Correlated Single Photon Counting*, Academic Press, London **1984**.

Covalys, mittlerweile New England BioLabs Inc., URL:

<http://www.neb.com/nebecomm/products/category140.asp?#141> (Abruf 29.12.2008).

Dalby, B.; Cates, S.; Harris, A.; Ohki, E.C.; Tilkins, M.L.; Price, P.J.; Ciccarone, V.C.: *Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications*. In: *Methods* **2004**, *33* (2), 95-103.

Damoiseaux, R.; Keppler, A.; Johnsson, K.: *Synthesis and application of chemical probes for human O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferase*. In: *ChemBioChem* **2001**, *2*, 285-287.

Darnell, J.E.; Kerr, I.M.; Stark, G.R.: *JAK-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signalling proteins*. In: *Science* **1994**, *264*, 1415-1421.

Eggeling, C.; Berger, S.; Brand, L.; Fries, J.R.; Schaffer, J.; Volkmer, A.; Seidel, C.A.M.: *Data registration and selective single-molecule analysis using multi-parameter fluorescence detection*. In: *J. Biotechnol.* **2001**, *86* (3), 163-180.

Eigen, M.; Rigler, R.: Sorting single molecules: Application to diagnostics and evolutionary biotechnology. In: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **1994**, 91 (13), 5740-5747.

Förster, Th.: Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. In: Ann. Phys. **1948**, 2, 55-75.

Grabowski, Z.R.; Grabowska, A.: *The Förster cycle reconsidered*. In: Z. Phys. Chem. **1976**, Neue Folge 101, 197-208.

Greulich, K.O.; Wolfrum, J.: Einsatz leistungsstarker UV-Laserpulse in Biotechnologie und Biomedizin. In: Bioengineering **1989**, 6, 69-70.

Griesbeck, O.; Baird, G.S.: Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein - Mechanism and applications. In: J. Biol. Chem. **2001**, 276 (31), 29188-29194.

Griffin, B. A.; Adams, S. R.; Tsien, R. Y.: Specific Covalent Labeling of Recombinant Protein Molecules Inside Living Cells. In: Science **1998**, 281, 269-272.

Griffin, B.A., Adams, S.R., Jones, J., and Tsien, R.Y.: *Fluorescent labeling of recombinant proteins in living cells with FIAsh*. In: Methods Enzym. **2000**, 327, 565-578.

Ha, T.; Enderle, T.; Chemla, D.S.; Selvin, R.P., Weiss, S.: *Single molecule dynamics studied by polarization modulation*. In: Phys. Rev. Lett. **1996**, 77, 3979-3982.

Heinlein, T.; Knemeyer, J.P.; Piestert, O.; Sauer, M.: *Nucleobase-specific quenching of fluorescent dyes in DNA-hairpins*. In: J. Phys. Chem. B **2003**, 107, 7957-7964.

Heinlein, T.: Development of Methods for Structure and Function Determination in Living and Fixated Cells on the Single-Molecule Level Based on Coincidence Analysis and Spectrally-Resolved Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy [SFLIM]. Inaugural Dissertation, Physikalisch-Chemisches Institut, Universität Heidelberg, **2004**.

Hendrix, J.; Flors, C.; Dedecker, P.; Hofkens, J.; Engelborghs, Y.: Dark States in Monomeric Red Fluorescent Protein Studied by Fluorescence Correlation Spectroscopy and Single Molecule Spectroscopy. In: Biophys. J. **2008**, 94, 4103-4113.

Herten, D.P.; Tinnefeld, P.; Sauer, M.: Identification of singly fluorescently labelled mononucleotide molecules in solution by spectrally resolved time-correlated single photon counting. In: Appl. Physics B **2000**, 71, 765-771.

Hewing, J.: noch nicht veröffentlichte Resultate, Inaugural Dissertation, Botanisches Institut, Technische Universität Darmstadt, **2009**.

Hirschfeld, T.: Optical microscopic observation of single small molecules. In: Appl. Optics **1976**, 15, 2965-2966.

Hirschfeld, T.: Quantum efficiency independence of the time integrated emission from *a fluorescent molecule*. In: Appl. Optics **1976**, 15, 3135-3139.

Hollas, J.M.: *Moderne Methoden in der Spektroskopie*. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig/Wiesbaden ²**1995**.

Ihle, J.N.: STATs: Signal Transducers and Activators of Transcription. In: Cell **1996**, 84, 331-334.

Invitrogen Corporation **2008**, URL:

<http://products.invitrogen.com/ivgn/en/US/adirect/invitrogen?cmd=catProductDetail&entryPoint=adirect&messageType=catProductDetail&showAddButton=true&productID=11668019>, (Abruf: 15.08.2008).

Juillerat, A.; Gronemeyer, T.; Keppler, A.; Gendreizig, S.; Pick, H.; Vogel, H.; Johnsson, K.: Directed Evolution of O⁶-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase for Efficient Labeling of Fusion Proteins with Small Molecules In Vivo. In: Chem. & Biol. **2003**, 10, 313-317.

Kannan, B.; Har, J.Y.; Liu, P.; Maruyama, I.; Ding, J.L.; Wohland, T.: *Electron Multiplying Charge-Coupled Device Camera Based Fluorescence Correlation Spectroscopy*. In: Anal. Chem. **2006**, 78, 3444-3451.

Kasha, M.: Characterization of electronic transitions in complex molecules. In: Disc. Faraday Soc. **1950**, 9, 14-19.

Kelley, A.M.; Michalet, X.; Weiss, S.: *Chemical Physics – single-molecule Spectroscopy Comes of Age*. In: *Science* **2001**, *292*, 1671-1672.

Keppler, A.; Gendreizig, S.; Gronemeyer, T.; Pick, H.; Vogel, H.; Johnsson, K.: *A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo*. In: *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 86-89.

Keppler, A.; Pick, H.; Arrivoli, C.; Vogel, H.; Johnsson, K.: *Labeling of fusion proteins with synthetic fluorophores in live cells*. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101* (27), 9955-9959.

Knemeyer, J.P.; Marmé, N.; Sauer, M.: *Probes for detection of specific DNA sequences at the single-molecule level*. In: *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 3717-3724.

Korlach, J.; Schwille, P.; Webb, W.W.; Feigensohn, G.W.: *Characterization of lipid bilayer phases by confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy*. In: *PNAS* **1999**, *96*, 8461-8466.

Kuricheti, K.K.; Buschmann, V.; Weston, K.D.: *Application of Fluorescence Correlation Spectroscopy for Velocity Imaging in Microfluidic Devices*. In: *Appl. Spectrosc.* **2004**, *58* (10), 1180-1186.

Lakowicz, J.R.: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York ²**1999**.

Los, G.V.; Darzins, A.; Karassina, N.; Zimprich, C.; Learish, R.; McDougall, M.G.; Encell, L.P.; Friedmann-Ohana, R.; Wood, M.; Vidugiris, G.; Zimmerman, K.; Otto, P.; Klaubert, D.H.; Wood, K.V.: *HalotagTM interchangeable labeling technology for cell imaging and protein capture*. **2005**, URL: http://www.promega.com/cnotes/cn011/cn011_02.pdf (Abruf: 03.08.2008).

Louis, T.; Schatz, G.H.; Klein-Bölting, P.; Holzwarth, A.R.; Ripamonti, G.; Cova, S.: *Performance comparison of a single-photon avalanche diode with a microchannel-plate photomultiplier in time-correlated single-photon counting*. In: *Rev. Sci. Instrum.* **1988**, *59*, 1148-1153.

Magde, D.; Elson, E.L.; Webb, W.W.: Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System – Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy. In: Phys. Rev. Lett. **1972**, 29, 705-708.

Madge, D.; Elson, E.L.; Webb, W.W.: Fluorescence correlation Spectroscopy II. an experimental realization. In: Biopolymers **1974**, 13 (1), 29-61.

Malvezzi-Campeggi, F.; Jahnz, M.; ze, K.G.; Dittrich, P.; Schwille, P.: *Light-induced flickering of Dsred provides evidence for distinct and inconvertible fluorescent states*. In: Biophys. J. **2001**, 81, 1776-1785.

Matz, M.V.; Fradkov, A.F.; Labas, Y.A.; Savitsky, A.P.; Zaraisky, A.G.; Markelov, M.L.; Lukyanov, S.A.: *Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species*. In: Nat. Biotechnol. **1999**, 17, 969-973.

Maus, M.; Cotlet, M.; Hofkens, J.; Gensch, T.; De Schryver, F.C.; Schaffer, J.; Seidel, C.A.M.: An experimental comparison of the maximum likelihood estimation and nonlinear least squares fluorescence lifetime analysis of single molecules. In: Anal. Chem. **2001**, 73, 2078-2086.

Meinhart, C.D.; Wereley, S.T.; Santiago, J.G.: *PIV measurements of a microchannel flow*. In: Exp. Fluids **1999**, 27, 414-419.

Michalet, X.; Pinaud, F.; Lacoste, T.D.; Dahan, M.; Bruchez, M.P.; Alivisatos, A.P., Weiss, S.: *Properties of Fluorescent Semiconductor Nanocrystals and their Application to Biological Labeling*. In: Single Molec. **2001**, 2 (4), 261-276.

Moerner, W.E.; Kador, L.: *Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid*. In: Phys. Rev. Lett. **1989**, 62, 2535-2538.

Neher, E.; Sakmann, B.: Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. In: Nature **1976**, 260, 799-802.

Orrit, M.; Bernard, J.: Single pentacene molecules detected by fluorescence excitation in a p-terphenyl crystal. In: Phys. Rev. Lett. **1990**, 65, 2716-2719.

Mottram, L.F.; Maddox, E.; Schwab, M.; Beaufils, F.; Peterson, B.R.: *A Concise Synthesis of the Pennsylvania Green Fluorophore and Labeling of Intracellular Targets with O⁶-Benzylguanine Derivatives*. In: *Organic Letters* **2007**, 9 (19), 3741-3744.

Patterson, G.H.; Lippincott-Schwartz, J.: *A Photoactivatable GFP for Selective Photolabeling of Proteins and Cells*. In: *Science* **2002**, 297, 1873-1877.

Pawley, J.B.: *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Plenum Press, New York **1995**.

Peloquin, J.J.; Thibault, S.T.; Schouest, L.P.; Miller, Jr.; Miller, T.A.: *Electromechanical Microinjection of Pink Bollworm (*Pecti nophora gossypiella*) Embryos Increases Survival*. In: *BioTechniques* **1997**, 22, 496-499.

Petersen, N.O.; Höddelius, P.L.; Wiseman, P.W., Seger, O.; Magnusson, K.-E.: *Quantification of Membrane Receptor Distributions by Image Correlation Spectroscopy: Concept and Application*. In: *Biophys. J.* **1993**, 65, 1135-1146.

Plugge, B.; Gazzarrini, S.; Nelson, M.; Cerana, R.; Van Etten, J.L.; Derst, C.; DiFrancesco, D.; Moroni, A.; Thiel, G.: *A Potassium Channel Protein Encoded by Chlorella Virus PBCV-1*. In: *Science* **2000**, 287, 1641-1644.

Prasher, D.C.; Eckenrode, V.K.; Ward, W.W.; Prendergast, F.G.; Cormier, M.J.: *Primary structure of the Aequorea Victoria green fluorescent protein*. In: *Gene* **1992**, 111, 229-233.

Rehm, D.; Weller, A.: *Kinetik und Mechanismus der Elektronenübertragung bei der Fluoreszenzlöschung in Acetonitril*. In: *Ber. Bunsenges. Physik. Chem.* **1969**, 73, 834-839.

Rigler, R.; Widengren, J.: *Ultrasensitive Detection of Single Molecules by Fluorescence Correlation Spectroscopy*. In: *Bioscience* **1990**, 3, 180-183.

Rigler, R.; Mets, Ü.: *Diffusion of single molecules through a Gaussian laser beam*. In: *SPIE Vol. 1921, laser spectroscopy of biomolecules* **1992**, 239-248.

Rigler, R.; Mets, Ü.; Widengren, J; Kask, P.: Fluorescence Correlation Spectroscopy with high count rate and low background analysis of translational diffusion. In: Eur. Biophys. J. **1993**, 22 (3), 169-175.

Roth, C.M.: Untersuchungen in lebenden Zellen mit Hilfe neuer Methoden der Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie. Inaugural Dissertation, Physikalisch-Chemisches Institut, Universität Heidelberg, **2006**.

Roth, C.M.; Heinlein, P.I.; Heilemann, M.; Hertel, D.-P.: Imaging *Diffusion in Living Cells Using Time-Correlated Single-Photon Counting*. In: Anal. Chem. **2007**, 79 (19), 7340-7345.

Rust, M.J.; Bates, M.; Zhuang, X.: *Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)*. In: Nature Methods **2006**, 3, 793-796.

Schindler, C., Darnell Jr., J.E.: *Transcriptional Response to Polypeptide Ligands: The JAK-STAT Pathway*. In: Annu. Rev. Biochem. **1995**, 64, 621-651.

Schlüter, P.I.: *Counting of single molecules in living cells for the development of in-vivo analytics*. Diplomarbeit, Physikalisch-Chemisches Institut, Universität Heidelberg, **2004**.

Schwille, P.; Bieschke, J.; Oehlenschläger, F.; Kinetic Investigations by Fluorescence Correlation Spectroscopy: The Analytical and Diagnostic Potential of Diffusion Studies, In: Biophys. Chem. **1997**, 66, 211-228.

Schwille, P.; Korch, J.; Webb, W.W.: Fluorescence Correlation Spectroscopy with Single-Molecule Sensitivity on Cell and Model Membranes. In: Cytometry **1999**, 36, 176-182.

Schwille, P; Haustein, E.: *Fluorescence Correlation Spectroscopy – An Introduction to its Concepts and Applications*. **2004** URL: <http://www.biophysics.org/education/schwille.pdf> (Abruf: 25.07.2008).

Shaner, N.C.; Campbell, R.E.; Steinbach, P.A., Giepmans, B.N.G.; Palmer, A.E.; Tsien, R.Y.: *Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. Red fluorescent protein*. In: Nat. Biotechnol. **2004**, 22 (12), 1567-1572.

Shaner, N.C.; Steinbach, P.A., Tsien, R.Y.: *A guide to choosing fluorescent proteins*. In: Nat. Methods **2005**, 2, 905-909.

Shimomura, O.; Johnson, F.H.; Saiga, Y.: Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea. In: J. Cell. Comp. Physiol. **1962**, 59, 223-239.

Seidel, C.A.M.; Schulz, A.; Sauer, M.: Nucleobase-Specific Quenching of Fluorescent Dyes. 1. Nucleobase One-Electron Redox Potentials and Their Correlation with Static and Dynamic Quenching Efficiencies. In: J. Phys. Chem. **1996**, 100 (13), 5541-5553.

Simone, N.L.; Bonner, R.T.F.; Gillespie, J.W.; Emmert-Buck, M.R.; Liotta, L.A.: *Laser-capture microdissection: opening the microscopic frontier to molecular analysis*. In: Trends in Genetics **1998**, 14 (7), 272-276.

Soper, S.A.; Legendre, B.L.: Error Analysis of Simple Algorithms For Determining Fluorescence Lifetimes in Ultradilute Dye Solutions. In: Appl. Spectrosc. **1994**, 48, 400-405.

Steinkamp, J.A.: *Flow Cytometry*. In: Rev. Sci. Instrum. **1984**, 55 (9), 1375-1400.

Stöhr, K.: *Fluoreszenzgelöschte Sonden für diagnostische und analytische Anwendungen*. Inaugural Dissertation, Physikalisch-Chemisches Institut, Universität Heidelberg, **2008**.

Stryer, L.: Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. In: Ann. Rev. Biochem. **1978**, 47, 819-846.

Tellinghuisen, J.; Wilkerson Jr., C.W.: Bias and precision in the estimation of exponential decay parameters from sparse data. In: Anal. Chem. **1993**, 65, 1240-1246.

Tinnefeld, P.; Buschmann, V.; Herten, D.-P.; Han, K.-T., Sauer, M.: *Confocal fluorescence lifetime imaging (FLIM) at the single molecule level*. In: Single Mol. **2000**, 1, 215-223.

Tinnefeld, P.: Multiparameter Single Molecule Spectroscopy Based on Spectrally-Resolved Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy [SFLIM]. Inaugural Dissertation, Physikalisch-Chemisches Institut, Universität Heidelberg, **2002**.

Tinnefeld, P.; Weston, K.D.; Vosch, T.; Cotlet, M.; Weil, T.; Hofkens, J.; Müllen, K.; De Schryver, F.C.; Sauer, M.: *Antibunching in the Emission of a Single Tetrachromophoric Dendritic System*. In: J. Am. Chem. Soc. **2002**, 124, 14310-14311.

Tokalov, S.V.; Henker, Y.; Schwab, P.; Metz, P.; Gutzeit, H.O.: *Toxicity and Cell Cycle Effects of Synthetic 8-Prenylnaringenin and Derivatives in Human Cells*. In: Pharmacology **2004**, 71 (1), 46-56.

Tsien, R.Y.: *The Green Fluorescent Protein*. In: Annu. Rev. Biochem. **1998**, 67, 509-544.

Verkhusha, V.V.; Lukyanov, K.A.: The molecular properties and applications of Anthozoa fluorescent proteins and chromoproteins. In: Nature Biotechnology **2004**, 22 (3), 289-296.

Wahl, M.; Gregor, I.; Patting, M.; Enderlein, J.: Fast calculation of fluorescence correlation data with asynchronous time-correlated single-photon counting. In: Optics Express **2003**, 11 (26), 3583-3591.

Wang, L.; Jackson, W.C.; Steinbach, P.A.; Tsien, R.Y.: *Evolution of new nonantibody proteins via iterative somatic hypermutation*. In: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **2004**, 101 (48), 16745-16749.

Webb, W.W.: *Fluorescence Correlation Spectroscopy: Genesis, Evolution, Maturation and Prognosis*. In: Rigler, R.; Elson, E.S. (Hrsg.): Fluorescence Correlation Spectroscopy; Springer Verlag **2001**, 308.

Weiss, M.; Elsner, M.; Kartberg, F.; Nilsson, T.: *Anomalous Subdiffusion is a Measure for Cytoplasmic Crowding in Living Cells*. In: Biophys. J. **2004**, 87, 3518-3524.

Weiss, S.: Fluorescence Spectroscopy of Single Biomolecules. In: Science **1999**, 283, 1670-1676.

Weissmann, M.; Schindler, H.; Feher, G.: *Determination of molecular weights by fluctuation spectroscopy: Applications to DNA*. In: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **1976**, 73 (8), 2776-2780.

Weller, A.: Photoinduced electron transfer in solution: exciplex and radical ion pair formation free enthalpies and their solvent dependence. In: Z. Phys. Chem. **1982**, Neue Folge 133, 93-98.

Weston, K.D.; Dyck, M.; Tinnefeld, P.; Müller, C.; Hertel, D.-P.; Sauer, M.: Measuring the Number of Independent Emitters in Single-Molecule Fluorescence Images and Trajectories Using Coincident Photons. In: Anal. Chem. **2002**, 74, 5342-5349.

Widengren, J.; Mets, Ü.; Rigler, R.: Fluorescence Correlation Spectroscopy in Solution: A Theoretical and Experimental Study. In: J. Phys. Chem. **1995**, 99, 13368-13379.

Wiedenmann, J.; Schenk, A.; Röcker, C.; Girod, A.; Spindler, K.-D.; Nienhaus, G.U.: A far-red fluorescent protein with fast maturation and reduced oligomerization tendency from *Entacmaea quadricolor* (Anthozoa, Actinaria). In: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **2002**, 99 (18), 11646-11651.

Wiseman, P.W.; Squier, J.A., Ellisman, M.H., Wilsom, K.R.: *Two-Photon image correlation spectroscopy and image cross-correlation spectroscopy*. In: J. Microsc. **2000**, 200 (1), 14-25.

Zhang, J; Campbell, R.E.: *Creating new fluorescent probes for cell biology*. In: Nat Rev Mol Cell Biol. **2002**, 3, 906-918.

Zhao, M.; Jin, L.; Chen, B.; Ding, Y.; Ma, H.; Chen, D.: *Afterpulsing and its correction in fluorescence correlation spectroscopy experiments*. In: Appl. Opt. **2003**, 42, 4031-4036.

Zuker, M.; Mathews, D. H.; Turner, D. H.: Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide. In: J. Barciszewski, B. F. C. Clarke (Eds). RNA Biochemistry and Biotechnology, NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, **1999**, 11-43.

www 1: http://web.aibn.uq.edu.au/cbn/research_biomolecular_files/dsredmonomer2.jpg
(Abruf: 12.11.2008).

www 2:

http://www.univie.ac.at/mikroskopie/3_fluoreszenz/img_fluoreszenz/aequorea_victoria.jpg

(Abruf: 12.11.2008).

www 3: http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/ (Abruf 13.11.2008).

7. Anhang

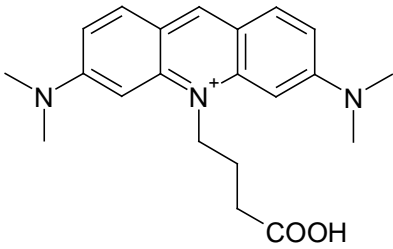
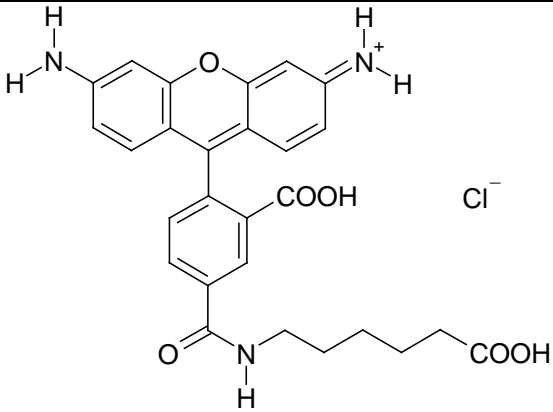
7.1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

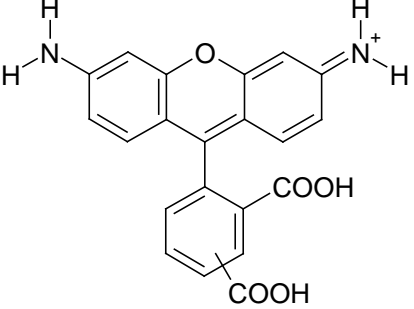
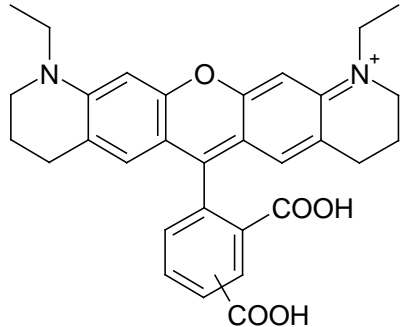
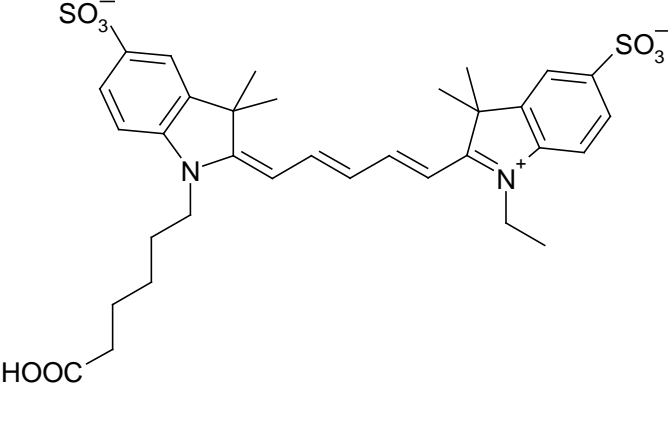
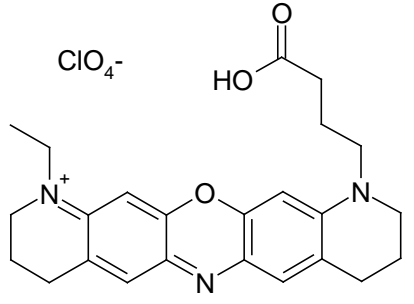
λ	Wellenlänge
A	Adenin
APD	Avalanche Photo Diode (Lawinen-Photodiode)
BG	Benzylguanin
C	Cytosin
CHO	Chinesische Hamsterovarien
CP	4-(4-(aminomethyl)benzyloxy)-6-chloropyrimidin-2-amine
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DIFIM	Diffusion Imaging Microscopy
DIPEA	Diisopropylethylamin
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DsRed	rot fluoreszierendes Protein drFP583 aus der Koralle <i>Discosoma</i> (Tetramer)
ε	Extinktionskoeffizient
E. coli	Escherischia Coli
EMCCD	Electron Multiplying Charge-Coupled Device
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FCS	Fluorescence Correlation Spectroscopy
FCCS	Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy
FIAsH	Fluorescein Arsenical Helix Binder
FLIM	Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy
FRAP	Fluorescence-Recovery After Photobleaching
G	Guanin
GFP	Green Fluorescent Protein
H2B	Histon 2B

hAGT	humane O ⁶ -Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IC	internal conversion
ICM	Image Correlation Microscopy
ICS	Image Correlation Spectroscopy
ISC	Intersystem Crossing
kcal	Kilocalorien
Kcv	Kalium-Kanal, kodiert aus dem <i>Paramecium bursaria</i> Chlorella Virus (PBCV-1)
kDa	Kilodalton
kJ	Kilojoule
LED	Light Emitting Diode
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital
μ	Dipolmoment
M	molar
MCS	Multi Channel Scalar
MLE	Maximum Likelihood Estimator
NA	Numerische Apertur (<i>engl.</i> Numerical Aperture)
NHS	N-Hydroxy-Succinimidyl
NIH	National Institute of Health
NIH 3T3	Mäusefibroblasten
PBS	Phosphate Buffered Saline
PIV	Particle Image Velocimetry
PMT	Photomultiplier
ψ	Wellenfunktion
UV	Ultraviolett
mCherry	Fluoreszierendes Protein, Mutante von mRFP1
p. a.	pro analysis (analysenrein)
ReAsH	Resorufin Arsenical Helix Binder
RFP	Red Fluorescent Protein
mRFP	monomeric Red Fluorescent Protein
RNA	Ribonukleinsäure
sFCS	Scanning Fluorescence Correlation Spectroscopy
SP	Smart Probe
SPT	Single Particle Tracking

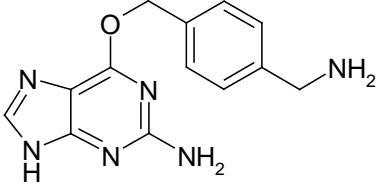
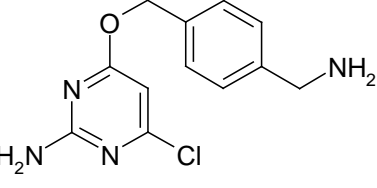
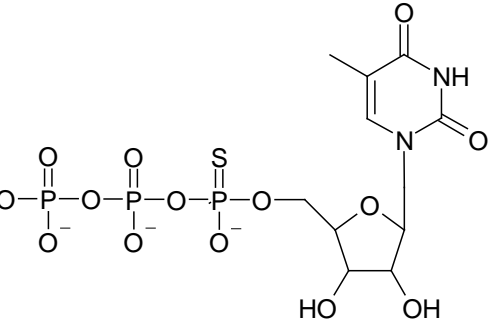
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
τ	Lebensdauer
T	Thymin
TEAA	Triethylammoniumacetat
TCSPC	Time-Correlated Single Photon Counting
U	Uracil
VIS	Visible
VR	Vibrational Relaxation
YFP	Yellow Fluorescent Protein

7.2. STRUKTUREN DER VERSCHIEDENEN FARBSTOFFE

Farbstoff	Struktur	λ_{abs} [nm]	λ_{em} [nm]
Atto 488	nicht angegeben	501	523
Atto 495		495	527
Dy 505		505	530

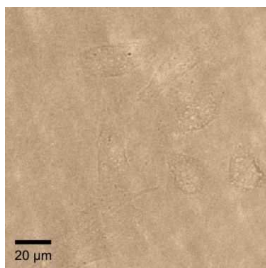
CbR 110		505	530
Atto 565		563	592
Atto620	nicht angegeben	619	643
Atto 633	nicht angegeben	629	657
Atto 647N	nicht angegeben	644	669
CY 5		646	664
MR 121		660	675
Atto 655	nicht angegeben	663	684

7.3. STRUKTUREN DER VERSCHIEDENEN SUBSTRATE

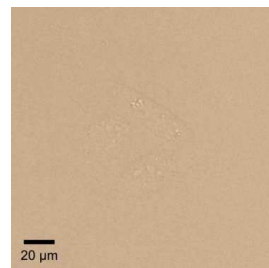
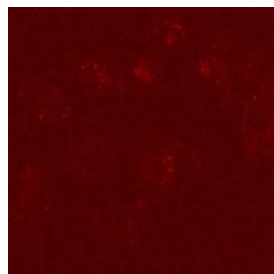
Substrat	Struktur	M _w [g/mol]
BG		270
CP		264
Monomer des modifizierten dT ₂₀		

7.4. ÜBERSICHT ÜBER DIE FARBSTOFFMARKIERUNG

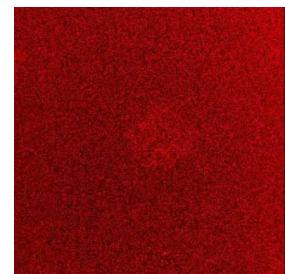
7.4.1. Inkubation

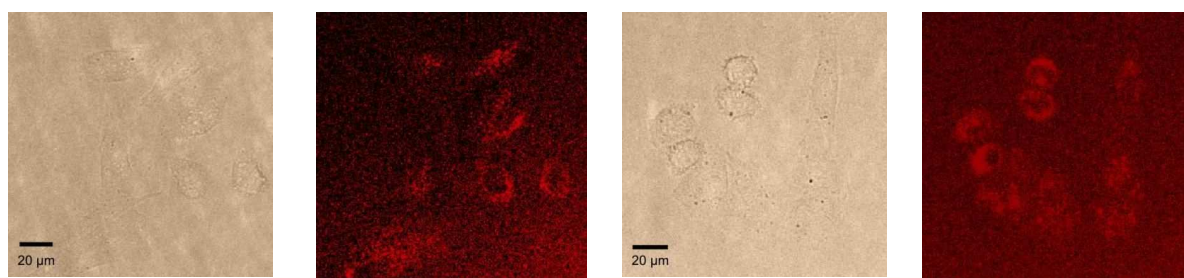


BG-Atto 620



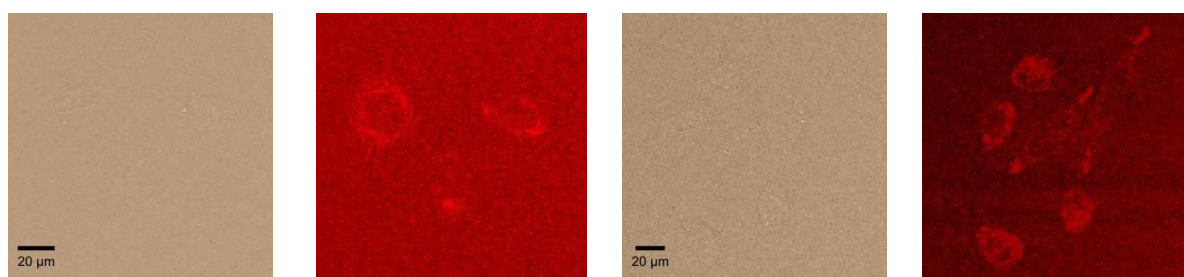
CP-Atto 620





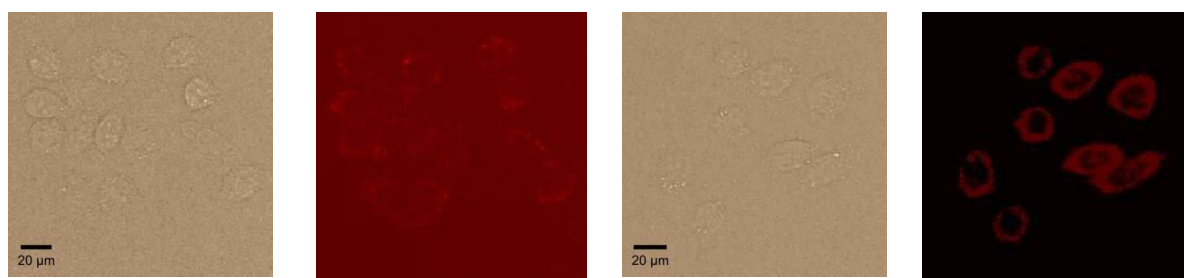
BG-Atto 633

CP-Atto 633



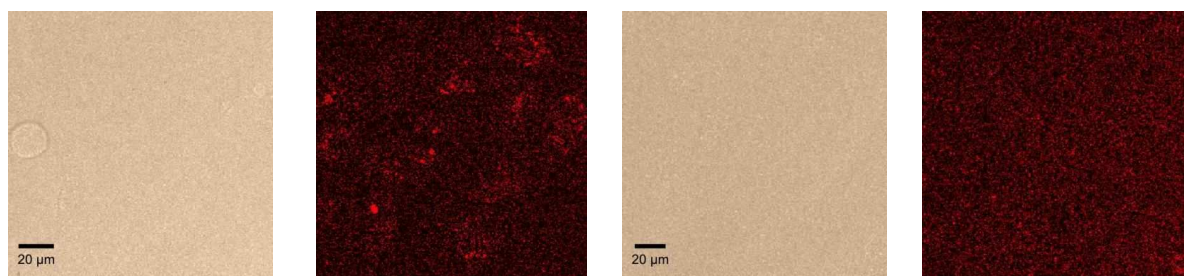
BG-MR 121

CP-MR 121



BG-Atto 647N

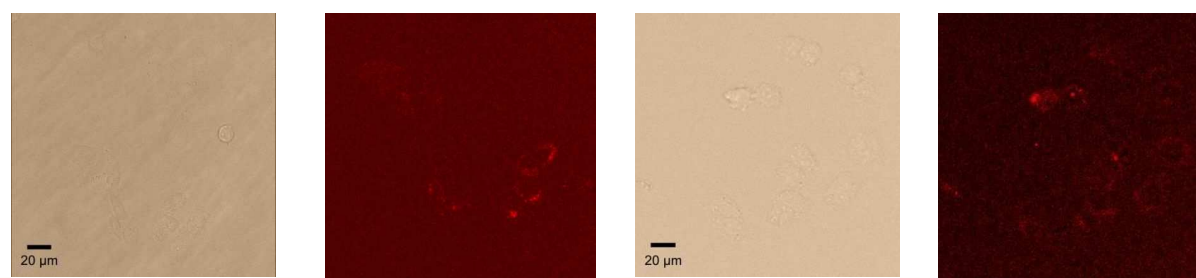
CP-Atto 647N



BG-CY 5

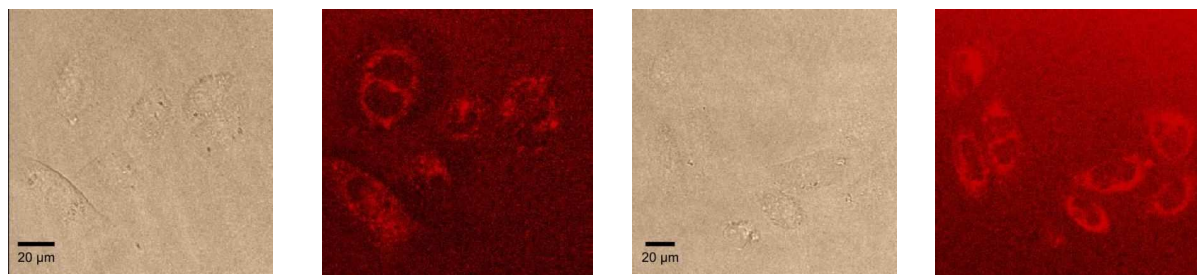
CP-CY 5

7.4.2. Lipofectamine 2000



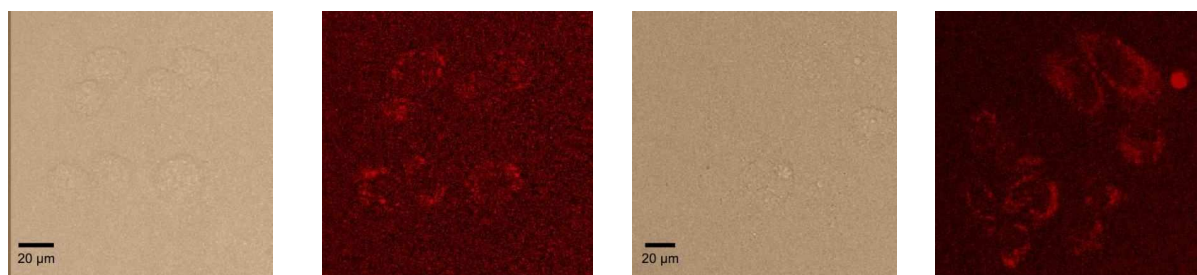
BG-Atto 620

CP-Atto 620



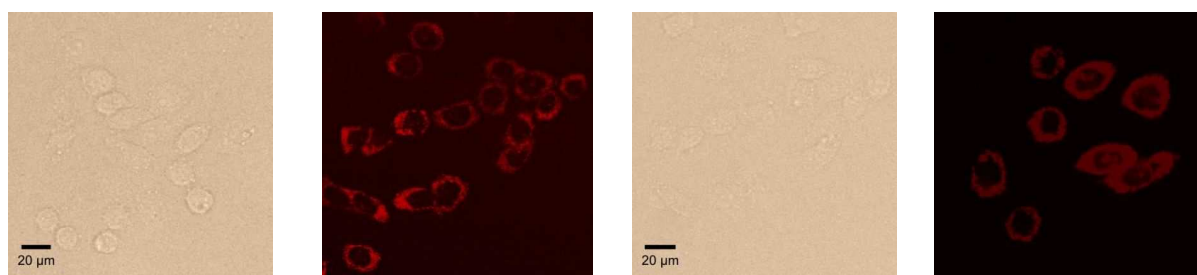
BG-Atto 633

CP-Atto 633



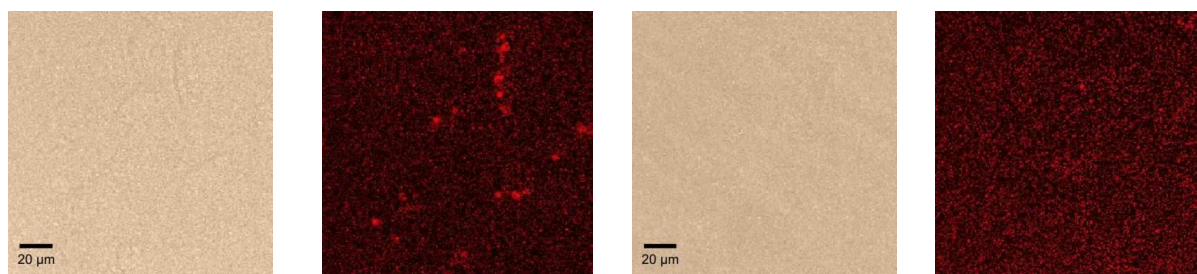
BG-MR 121

CP-MR 121



BG-Atto 647N

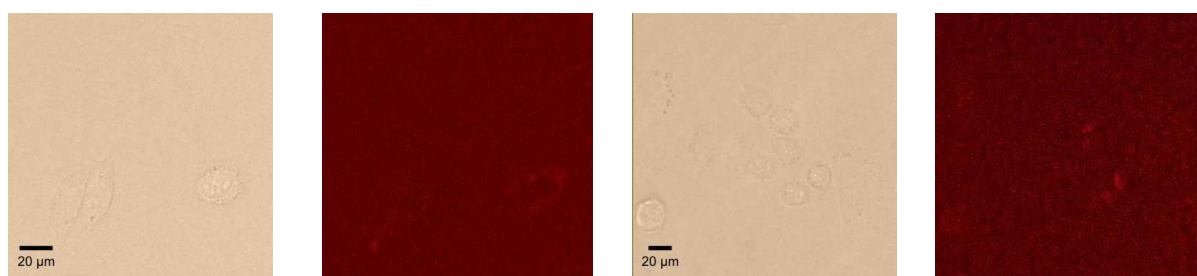
CP-Atto 647N



BG-CY 5

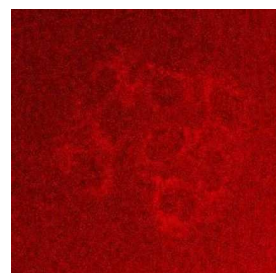
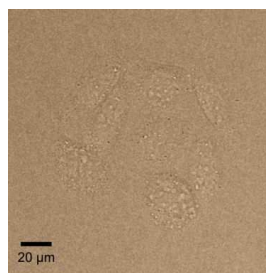
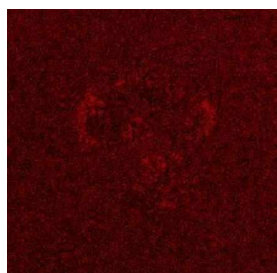
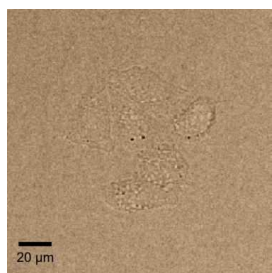
CP-CY 5

7.4.3. Streptolysin O



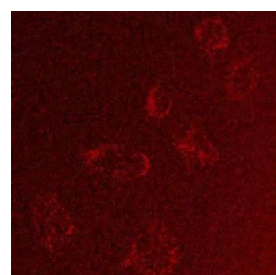
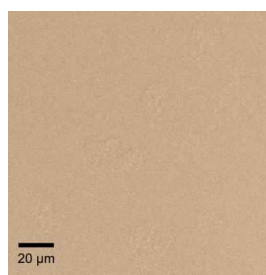
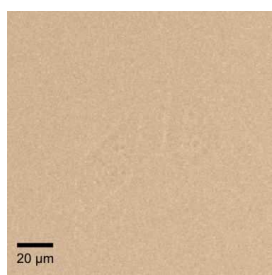
BG-Atto 620

CP-Atto 620



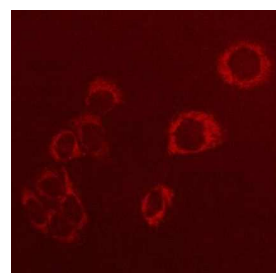
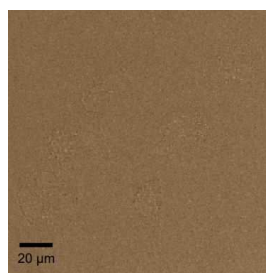
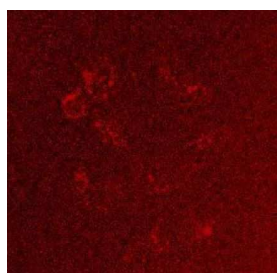
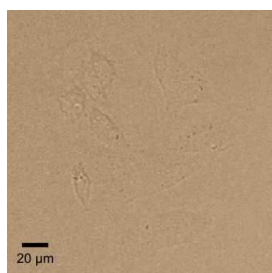
BG-Atto 633

CP-Atto 633



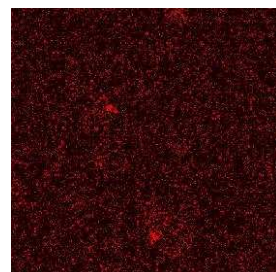
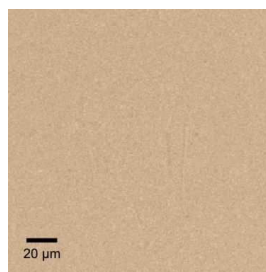
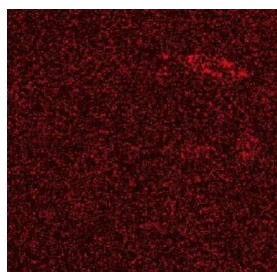
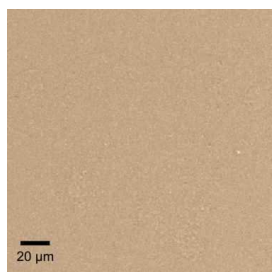
BG-MR 121

CP-MR 121



BG-Atto 647N

CP-Atto 647N



BG-CY 5

CP-CY 5

8. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Wolfrum und Herrn PD Dr. Dirk-Peter Herten möchte ich für das Überlassen des interessanten Themas und die vielen hilfreichen Tipps, Ideen und Diskussionen danken.

Dr. Andrea Pfeifer vom Deutschen Krebsforschungszentrum danke ich für so mache, STAT5b transduzierte Zelle und die Beantwortung meiner vielen biologischen Fragen.

Bei meiner Kooperationspartnerin Jenny Hewing vom Botanischen Institut in Darmstadt bedanke ich mich für die Versorgung mit diversen Fusionsproteinen und die vielen lustigen Stunden im Dunkeln vor dem Mikroskop – auch wenn die Zellen nicht immer das gemacht haben, was wir uns erhofft hatten.

Vielen lieben Dank an den Arbeitskreis der Einzelmolekülspektroskopie: Jessica Balbo, Daniel Barzan, Tanja Ehrhard, Anton Kurz, Michael Schwering, Daniel Sieberg, Christina Spassova, Anne Seefeld sowie Dr. Alexander Kiel, Dr. Mike Heilemann und Dr. Katharina Stöhr für viele Diskussionen und die großartige Arbeitsatmosphäre. Die Stunden bei diversen Weisswurstfrühstücken, Grillabenden, Ausflügen etc. waren immer lustig und ich werde die letzten vier Jahre nicht so schnell vergessen.

Dr. Kyung-Tae Han möchte ich an dieser Stelle ganz herzlich für die vielen Informationen über Fluorophore und Kopplungsreaktionen sowie die Hilfe mit der HPLC-Software danken.

Meine Kollegen Dr. Christian Roth und Haisen Ta danke ich ganz herzlich für die Hilfe mit so manchem LabView Problem.

Vielen Dank auch an Daniel Barzan, der mit so manchem Gel zu kämpfen hatte, um die Fusionsproteine mit mCherry zu erhalten.

Herzlicher Dank geht an Dr. Katharina Stöhr für ihre Unterstützung in Bezug auf den *SNAP-Tag*. Außerdem danke ich Ihr für die stete Fröhlichkeit mit der sie uns im Labor mit Knut, Flocke, Tubi und Coli versorgt hat. Ihr gilt auch meine tiefe Bewunderung, dass sie trotz ihrer Krankheit weitergekämpft hat. Wir haben mit Dir einen fröhlichen und hilfsbereiten Menschen viel zu früh verloren.

Großer Dank gilt auch meinen Kollegen und Freunden vom Graduiertenkolleg 1114: Julia Hahn, Jenny Hewing, Christian Heinisch, Stefan Hunsmann, Arno Kretschmer, Alexandru Popescu, Kai Schorstein, Jens von Staden und Karl Wunderle. Die Weinabende auf dem Balkon im Kleinwalsertal waren legendär.

Bei meinen Komilitoninnen Adriane Leskovar und Olivia Körner möchte ich für die vielen netten Dienstagmitage in der Mensa bedanken. Ich habe mich immer darauf gefreut. Vielen Dank auch für die vielen aufmunternden Worte, wenn meine Zellen mal wieder nicht kooperativ waren.

Vielen lieben Dank an alle, die diese Arbeit korrekturgelesen haben. Besonderer Dank gilt auch Mr. David Palmer, der sich sehr viel Mühe mit der Verbesserung der englischen Zusammenfassung gegeben und hilfreiche Anmerkungen gemacht hat.

Meinen Nachbarn Christiane und Björn Stecker möchte ich ganz herzlich für die vielen spontanen Babysitterdienste bedanken, die mir so manchen Freiraum ermöglicht haben.

Besonderer Dank geht an meine Eltern Monika und Helmut Schlüter, die mir nicht nur in finanzieller Hinsicht mein Studium ermöglicht haben. Danke für Euer unendliches Vertrauen in mich.

Meinen Sohn Quirin danke ich dafür, dass er mich mit seiner lebhaften Art und seinem Lachen daran erinnert hat, dass es auch ein Leben neben dem Schreiben gibt.

Unendlicher Dank gilt meinem Mann Thomas Heinlein, der so manche Laune nach einer langen Schreibnacht zu ertragen hatte. Vielen Dank für Deine stete gute Laune und Liebe, die mir sehr viel bedeutet.

„Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel durchgeführt habe.“

Heidelberg, im Januar 2009

Pia I. Heinlein

